



# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

## **FACULTAD DE NUTRICIÓN**

**PARTICIPACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN EL DESARROLLO DE  
LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS Y LA PROTECCIÓN INDUCIDA POR LA  
VACUNA ORAL MONOVALENTE.**

### **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN**

**P R E S E N T A:**

**LN TONANTZI GUADALUPE SÁMANO ROMÁN**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dra. Delia Vanessa López Guerrero**

**CODIRECTOR:**

**Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama**

**COMITÉ TUTORAL:**

**Dra. Ollín Celeste Martínez Ramírez**

**Dr. Juan Gabriel Navarrete-Vázquez**



*Monumento al ratón de laboratorio en Novosibirsk, Rusia. Fotografía de Anna Gorbunova*

*"Caminamos hacia el futuro, abriendo nuevas puertas y haciendo cosas nuevas, porque somos curiosos, y la curiosidad sigue conduciéndonos por nuevos caminos... Si puedes soñarlo puedes hacerlo, recuerda que todo esto comenzó con un ratón "*

**Walt Disney**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología Viral de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. El desarrollo del mismo fue financiado con recursos del proyecto 511-6/17-7262 PRODEP. La alumna recibió una beca para estudios de maestría por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), No. de Beca 477166, además del apoyo para llevar a cabo los tramites de obtención de grado otorgado en la convocatoria “Programa de Fortalecimiento Académico para indígenas: Apoyos complementarios para Mujeres Indígenas Becarias CONACYT 2019”.

## RESUMEN

La microbiota intestinal es un complejo ecosistema constituido por bacterias, archeas, hongos, bacteriófagos, virus eucariotes, los cuales mantienen una estrecha relación mutualista con el hospedero, sin embargo, poco se sabe de las interacciones entre las bacterias con el resto de componentes de la microbiota y su implicación en la salud, en este sentido, existen evidencias de que las bacterias de la microbiota intestinal participan en el establecimiento y desarrollo de ciertas enfermedades virales, como las causadas por norovirus, poliovirus o reovirus por mencionar algunos, pero para rotavirus la evidencia aun es limitada. Por esta razón, en el presente trabajo, se determinó el efecto de la modificación de la microbiota intestinal en el desarrollo de la infección por rotavirus, así como la respuesta protectora inducida por la vacuna oral monovalente comercial atenuada contra rotavirus. Para ello, se modificó la microbiota intestinal de ratones de la cepa BALB/c mediante el uso de antibióticos orales o intraperitoneales de amplio espectro, antes y después del reto con el rotavirus murino EDIM. Se analizó el desarrollo de la infección, así como la producción de anticuerpos intestinales y séricos durante y posterior a la infección; Así mismo, se evaluó la protección inducida por la vacuna oral monovalente ante la infección. Previo a la administración de la vacuna, se administraron antibióticos intraperitoneales con la finalidad de modificar la microbiota. Bajo estas condiciones, se encontró una disminución en la replicación del virus durante la infección viral y una disminución significativa en la respuesta protectora inducida por la vacuna oral.

## **ABSTRACT**

The intestinal microbiota is a complex ecosystem constituted by bacteria, archeas, fungi, bacteriophages, eukaryotic viruses, which maintain a close mutualistic relationship with the host, however, little is known about the interactions between the bacteria with the rest of the components of the microbiota and its implication in health, in this sense, there is evidence that the bacteria of the gut microbiota participate in the establishment and development of certain viral diseases, such as those caused by norovirus, poliovirus or reovirus to mention a few, but for rotavirus the evidence is still limited. For this reason, in the present work, the effect of the modification of the intestinal microbiota on the development of rotavirus infection was determinate, as well as the protective response induced by the commercial monovalent oral vaccine attenuated against rotavirus. For this, the intestinal microbiota of mice of the BALB / c strain was modified through the use of oral or intraperitoneal broad – spectrum antibiotics, before and after the challenge with the EDIM murine rotavirus. The development of the infection was analyzed, as well as the production of intestinal and serum antibodies during and after the infection; Likewise, the protection induced by the monovalent oral vaccine against infection was evaluated. Prior to the administration of the vaccine, intraperitoneal antibiotics were administrated in order to modify the microbiota. Under these conditions a decrease in virus replication was found during viral infection and a significant decrease in the protective response induced by the oral vaccine.

# Índice General

RESUMEN .....	III
ABSTRACT .....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE GRÁFICAS .....	VIII
LISTA DE TABLAS .....	IX
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	X
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1 Microbiota y su asociación con infecciones virales.....	9
2.2 Rotavirus .....	13
2.2.1 Epidemiología de rotavirus.....	13
2.2.2 Estructura.....	15
2.2.3 Ciclo de Replicación.....	16
2.2.4 Respuesta inmune en la infección por rotavirus. ....	19
2.2.5 Vacunas contra Rotavirus.....	21
2.2.6 Modelo murino de la infección por rotavirus .....	22
2.3 Participación de la microbiota en la modulación de la respuesta inmune y la producción de anticuerpos. ....	23
2.4 Uso de antibióticos durante infecciones virales.....	25
2.4.1 Nitazoxanida.....	26
2.4.2 Neomicina.....	27
2.4.3 Ampicilina.....	28
2.4.4 Rifaximina.....	29
2.4.5 Nifuroxazida .....	31
2.4.6 Vancomicina.....	32
2.5.7 Metronidazol.....	33
2.5.8 Ciprofloxacina .....	34
3. JUSTIFICACIÓN.....	36
4. HIPÓTESIS.....	37
5. OBJETIVOS .....	38
5.1 Objetivo General .....	38
5.1 Objetivos específicos .....	38
6. MATERIALES Y MÉTODOS. ....	39
6.1 Ratones.....	39

6.2 Virus.....	39
6.3 Antibióticos.....	40
6.4 Infección de ratones BALB/c con EDIM.....	42
6.5 Toma de muestras.....	43
6.5.1 Heces.....	43
6.5.2 Sueros.....	43
6.6 ELISA de captura para determinar la carga viral de antígeno viral en heces.....	44
6.7 ELISA para determinar la producción de IgA intestinales específicas contra rotavirus.....	46
6.8 ELISA de IgG's séricas totales específicas contra rotavirus.....	48
6.9 Evaluación de la modificación de la microbiota intestinal sobre la efectividad de la vacuna oral monovalente.....	49
6.10 Cuantificación de colonias bacterianas.....	50
6.11 Evaluación histológica del intestino.....	51
6.12 Análisis estadístico.....	53
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
7.1 Efecto del tratamiento con antibióticos vía oral previo a la infección por rotavirus.....	54
7.2 Efecto del tratamiento con antibióticos vía oral durante la infección por rotavirus.....	57
7.3 Efecto del tratamiento con antibióticos de amplio espectro vía intraperitoneal sobre la infección por rotavirus.....	60
7.4 Efecto del tratamiento antibiótico sobre la protección adquirida con la vacuna oral atenuada contra rotavirus.....	62
7.5 Comprobación del efecto del tratamiento antibiótico sobre la microbiota intestinal.....	66
7.6 Análisis histológico del intestino delgado de ratones tratados con antibióticos.....	68
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>70</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>79</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>91</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

**FIGURA 1.** Factores que modifican la microbiota intestinal. Pág.12

**FIGURA 2.** Interacciones entre bacterias y virus. Pág.19

**FIGURA 3.** Diagrama de la estructura de rotavirus. Pág.24

**FIGURA 4.** Ciclo de replicación de Rotavirus infección. Pág. 26

**FIGURA 5.** Infección por Rotavirus y respuesta inmune Pág.28

**FIGURA 6.** Cortes histológicos de intestino delgado correspondiente a ratones sometidos a tratamiento antibiótico durante 3 días y sus controles. Pág.7

## LISTA DE GRÁFICAS

**GRÁFICA 1.** Curva de excreción de antígeno viral en ratones infectados con rotavirus EDIM. Pág. 61

**GRÁFICA 2.** Curva de excreción de antígeno viral en ratones infectados con rotavirus EDIM, tratados previo a la infección con antibióticos lumbinales contra el grupo control. Pág. 63

**GRÁFICA 3.** Curva de excreción de antígeno viral en ratones infectados con rotavirus EDIM, tratados durante la infección con antibióticos lumbinales contra el grupo control. Pág. 65

**GRÁFICA 4.** Producción de IgA intestinales específicas contra rotavirus en ratones infectados con rotavirus EDIM, tratados durante la infección con antibióticos lumbinales contra el grupo control. Pág. 66

**GRÁFICA 5.** Curva de excreción de antígeno viral, porcentaje de reducción de la infección, producción de IgA intestinales y producción de IgG totales séricas específicas contra rotavirus en ratones infectados con rotavirus EDIM, tratados previo a la infección con antibióticos de amplio espectro vía intraperitoneal. Pág.68

**GRÁFICA 6.** Curva de excreción viral de la vacuna oral atenuada en ratones tratados con antibiótico y el grupo control. Pág. 69

**GRÁFICA 7.** Curva de excreción de antígeno viral en ratones infectados con rotavirus EDIM, tratados con antibiótico y vacunados con la vacuna oral monovalente contra rotavirus previo a la infección. Pág. 70

**GRÁFICA 8.** Producción de IgA específicas contra rotavirus EDIM en heces de los ratones vacunados con  $7.3 \times 10^4$  DICC de la vacuna oral monovalente y el grupo control. Pág. 71

**GRÁFICA 9.** Producción de IgG totales específicas contra rotavirus EDIM presentes en los sueros de los ratones vacunados con  $7.3 \times 10^4$  DICC de la vacuna oral monovalente y el grupo control. Pág.72

**GRÁFICA 10.** UFC encontradas en las heces de ratones tratadas con antibióticos de amplio espectro y sus controles. Pág. 74

## **LISTA DE TABLAS**

**TABLA 1.** Composición del Coctel 1 de antibióticos intraperitoneales. Pág. 48

**TABLA 2.** Composición del Coctel 2 de antibióticos intraperitoneales. Pág. 49

**TABLA 3.** Antibióticos orales. Pág. 59

**TABLA 4.** Conteo de colonias bacterianas post tratamiento antibiótico Pág. 59

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

**AP:** Fosfatasa Alcalina (del inglés alkaline phosphatase)

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNdc:** Ácido ribonucleico de doble cadena

***C. difficile:*** *Clostridium difficile*

**DICC:** Dosis infectantes de cultivo celular

**DLPs:** Partículas doble capa (del inglés: double lipid particles)

***E. coli:*** *Escherichia coli*

**EDIM:** Diarrea epizootica de ratones infantiles (del inglés: epizootic diarrhea infant mouse).

**ELISA:** Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés: enzyme-linked immunoabsorbent assay)

**ENSANUT:** Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

***H. pylori:*** *Helicobacter pylori*

**HRP:** Peroxidasa de rábano (del inglés: Horseradish peroxidase)

**Hsp:** Proteína de choque térmico (del inglés: Heat shock protein)

**IgA:** Inmunoglobulina A

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IL-4:** Interleucina 4

**IL-6:** Interleucina 6

**INSP:** Instituto Nacional de Salud Pública

**IP:** Intraperitoneal

**LPS:** Lipopolisacáridos

**MI:** Microbiota intestinal

**NF- $\kappa$ B:** Factor de necrosis kappa beta

**NSP:** Proteína no estructural

**p.i. :** Post Infección

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PRR's:** Receptores de reconocimiento de patrones de patógenos (del inglés: pathogen recognition receptors)

**RV:** Rotavirus

**RRV:** Rotavirus Rhesus de Simio

**Tc CD8<sup>+</sup>:** Linfocito T citotóxico CD8

**TLR:** Receptores tipo Toll

**TNC:** (Tris, Cloruro de sodio, Cloruro de calcio)

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**UFC:** Unidades Formadoras de Colonias

**Uff:** Unidades Formadoras de focos

**VP:** Proteína Viral (del inglés: viral protein)

## 1. INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal es el conjunto de microorganismos que habitan dentro del lumen y en estrecha interacción con las micro vellosidades intestinales formado principalmente por bacterias, archeas, hongos y virus, generando una compleja red de interacciones que mantienen un delicado equilibrio entre las distintas poblaciones denominado como eubiosis (1). Estos microorganismos establecen una asociación comensal con el hospedero, y actualmente se sabe que influyen en diversos procesos metabólicos, endocrinos e inmunológicos, por lo que ahora es propuesto como un órgano adicional (2).

Las poblaciones bacterianas que habitan en el intestino humano se han dividido en 4 filotipos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*, de los cuales los dos primeros son los más abundantes (3). Estas poblaciones colonizan a manera de gradiente distintos sitios anatómicos, la colonización depende de la porción del intestino, de las características del epitelio intestinal, las secreciones del mismo, los nutrientes disponibles, además de factores intrínsecos como la concentración de oxígeno, la cantidad de moco y la presencia de péptidos antimicrobianos o de IgA ambos producidos por el sistema inmune del hospedero (4,5).

La colonización por parte de las bacterias para formar la microbiota intestinal inicia al momento del nacimiento (6). Es adquirida de la madre, e incluso recientes investigaciones sugieren que durante la vida intrauterina hay presencia de antígenos bacterianos en la placenta y el líquido amniótico (7).

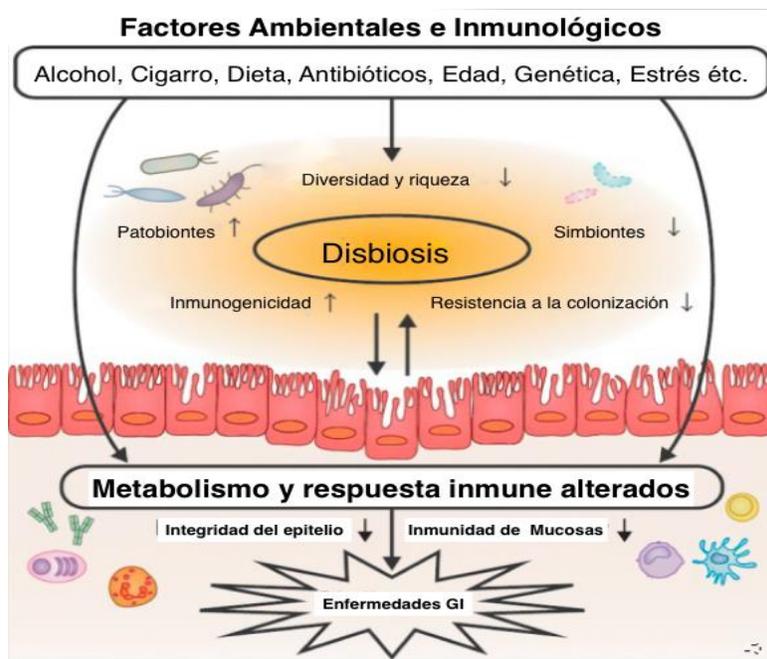
El momento del alumbramiento es un episodio clave en la colonización del hospedero por las poblaciones bacterianas, ya que dependiendo de la vía de nacimiento, por canal vaginal o por cesárea, el tipo y la diversidad bacteriana del individuo son diferentes (8); sin restar importancia a la lactancia que por medio de sus componentes ayuda de manera importante a la conformación de la microbiota intestinal (9). Esta suma de factores tiene un papel determinante en la salud del hospedero, ya que si el equilibrio entre los organismos que componen la microbiota llega a verse perturbado el estado de salud del mismo suele quebrantarse, alterando procesos inmunes, causando inflamación o alteraciones metabólicas (2).

La microbiota en equilibrio es necesaria para mantener un estado óptimo de salud. Esto se ha demostrado en animales libres de gérmenes (germ-free), los cuales tienen un sistema inmune atrofiado que no responde de manera adecuada ante los estímulos del medio. Lo cual, se infiere, está relacionado con las condiciones de nacimiento y el ambiente estéril en el que se desarrollan desde el momento de su concepción hasta la vida adulta. Estos animales son considerados como estériles pues no poseen microbiota en ningún sitio anatómico y no son expuestos a ningún componente microbiano (10).

La microbiota es diferente de individuo a individuo y puede ser modificada por distintos factores: la dieta, la genética del hospedero, el uso de antibióticos, el consumo de agua clorada, entre otros (11).

Se ha demostrado que la disbiosis (desequilibrio entre las poblaciones), promueve estados de salud alterados que inducen inflamación crónica, debido a un aumento en la permeabilidad intestinal que permite el paso de componentes bacterianos que activan al sistema inmune a través de los receptores PPR (pathogen pattern recognition receptor), entre ellos los receptores Toll-like (TLR) (12) .

Los ligandos de los receptores TLR son principalmente componentes presentes en patógenos como el LPS y el RNA de doble cadena de algunos virus, que al interactuar con su TLR activan diferentes vías de señalización, que a su vez, activan a diferentes factores de transcripción como en NF- $\kappa$ B provocando la producción de citocinas pro inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y la IL-6, lo cual se ha relacionado con el aumento en la resistencia a la insulina, desregulación hormonal, susceptibilidad a infecciones entre otros (12), sin embargo, esto se da solo cuando hay un desequilibrio en este delicado ecosistema (figura 1).



**Figura 1. Factores que modifican la microbiota intestinal.** La alteración de la microbiota intestinal puede ocasionarse por diversos factores ambientales como la dieta o el uso de antibióticos, lo cual ocasiona un desequilibrio entre poblaciones o *Disbiosis*. La Disbiosis es causa de funciones metabólicas o inmunológicas alteradas que repercuten en la salud del hospedero (13) .

La presencia de la microbiota intestinal es *per se*, un reto para el sistema inmunológico ya que debe mantener un crecimiento controlado de sus poblaciones teniendo una función de barrera que dificulta el establecimiento de patógenos que pueden infectar a las células intestinales provocando múltiples patologías (2).

Por su naturaleza anatómica y funcional, el intestino es el órgano de mayor contacto con microorganismos siendo el principal portal de entrada para patógenos entre los cuales encontramos a distintas familias de virus, los cuales pueden causar enfermedades diarreicas o sistémicas que pueden llegar a poner el riesgo la vida (7).

El intestino es, por tanto, un sitio estratégico para el sistema inmune, ya que tiene que responder a los patógenos y al mismo tiempo mantener un estado tolerogénico debido a la gran cantidad de antígenos a la que se ve expuesto, tanto alimenticios como de origen microbiano.

En lo que al aspecto metabólico se refiere las bacterias del intestino ayudan a la digestión y metabolismo de diversos nutrimentos, así como a la síntesis de otros. La fibra contenida en alimentos como granos, leguminosas y verduras es fermentada en la superficie intestinal, aportando beneficios al hospedero y a las bacterias (14).

Uno de los aspectos que cabría resaltar en las múltiples aportaciones de la microbiota al metabolismo es la producción de vitamina K , la cual es una vitamina liposoluble que participa activamente en los procesos de coagulación así como en la formación de eritrocitos, su biodisponibilidad en alimentos es mínima, lo cual dificulta cubrir los requerimientos diarios por medio de la dieta, pero se ve compensado por la producción en el epitelio intestinal por bacterias como *E. coli* (15).

## 2. ANTECEDENTES

La microbiota intestinal participa de manera importante en diversos procesos fisiológicos como la modulación de la respuesta inmune, la digestión y metabolismos de macro o micronutrientes, entre otros. Hasta la fecha se han identificado poco más de 1500 especies bacterianas residiendo en el lumen intestinal, dichas comunidades varían en cantidad y especie dependiendo de la zona del intestino, ya que las condiciones ambientales dadas por la mucosa intestinal ya sea pH, moco o concentración de oxígeno son factores determinantes para la supervivencia de ciertas especies, de tal manera que entre más cerca estén del colón trasverso menor será la concentración de oxígeno y por tanto existirá un mayor número de bacterias anaerobias (16).

En el caso de enfermedades virales entéricas, se ha observado que la administración de antibióticos parece tener un efecto benéfico, tal es el caso de la Rifaximina y la Nifuroxazida, antibióticos lumbinales de muy baja absorción, que cuando son administrados en pacientes con diarreas de etiología desconocida mejoran notablemente. Al evaluarse la administración de estos antibióticos en gastroenteritis virales se observa un acortamiento en los días de diarrea, por lo que la recuperación es más rápida. Estos antibióticos no poseen una actividad antiviral demostrada, pero se sabe que eliminan poblaciones bacterianas que posiblemente sirvan a los virus para poder infectar de manera más eficiente. Se sabe que algunos virus que inician su ciclo infectivo en el intestino utilizan elementos de las bacterias

como el lipopolisacárido (LPS) a su favor, facilitando su estabilidad y entrada a la célula blanco (17).

Se ha reportado que alterar las poblaciones bacterianas al eliminar ciertas especies del intestino mediante el tratamiento previo con antibióticos, influye directamente en la duración de la infección por rotavirus tanto en humanos como en ratón, en donde se observó que la excreción del virus en heces se ve disminuida en presencia de los antibióticos Neomicina y Amplicilina administrados vía oral, en comparación al grupo control y la producción de IgA e IgG parece aumentarse (12). Este fenómeno también es observado en ratones libres de gérmenes, lo que sugiere que rotavirus interactúa con la microbiota para llevar a cabo una infección exitosa, y que ésta es importante en la producción de anticuerpos específicos.

El estudio realizado por Harris *et al* en 2018, por ejemplo, mostró que la administración de antibióticos de amplio espectro por un periodo de 7 días antes de la vacunación contra rotavirus en un grupo de 21 adultos voluntarios modificó sustancialmente las poblaciones bacterianas, disminuyendo la cantidad de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* presentes en el lumen y aumentando la cantidad de *Proteobacterias*, hecho que alteró la respuesta inmune incrementando significativamente la producción de anticuerpos específicos (18).

Si bien las interacciones bacteria-virus parecen ser una estrategia evolutiva de los virus para optimizar la infección, estas interacciones también son necesarias para la inducción de protección de las vacunas atenuadas orales. Tal es el caso de la vacuna contra rotavirus y la vacuna contra la polio, ambas utilizan virus vivos atenuados, los cuales generan un ciclo de infección el cual no suele ser sintomático pero si suficiente para montar una respuesta inmune efectiva, y una memoria inmunológica a largo plazo.

En la actualidad, el modelo murino de rotavirus permite visualizar en condiciones controladas y en un periodo de tiempo corto los efectos de la infección, permitiendo evaluar y disectar el sistema en todos los componentes que acompañan a la infección, y el análisis de la respuesta inmune contra el virus y los mecanismos de limpieza del mismo. Además, nos permite analizar de manera histológica muy detallada la mucosa intestinal y los órganos asociados al intestino durante el tratamiento con antibióticos y durante la infección. Así mismo, es posible el análisis de los componentes de la microbiota que pueden ser partícipes en el establecimiento del virus y su replicación.

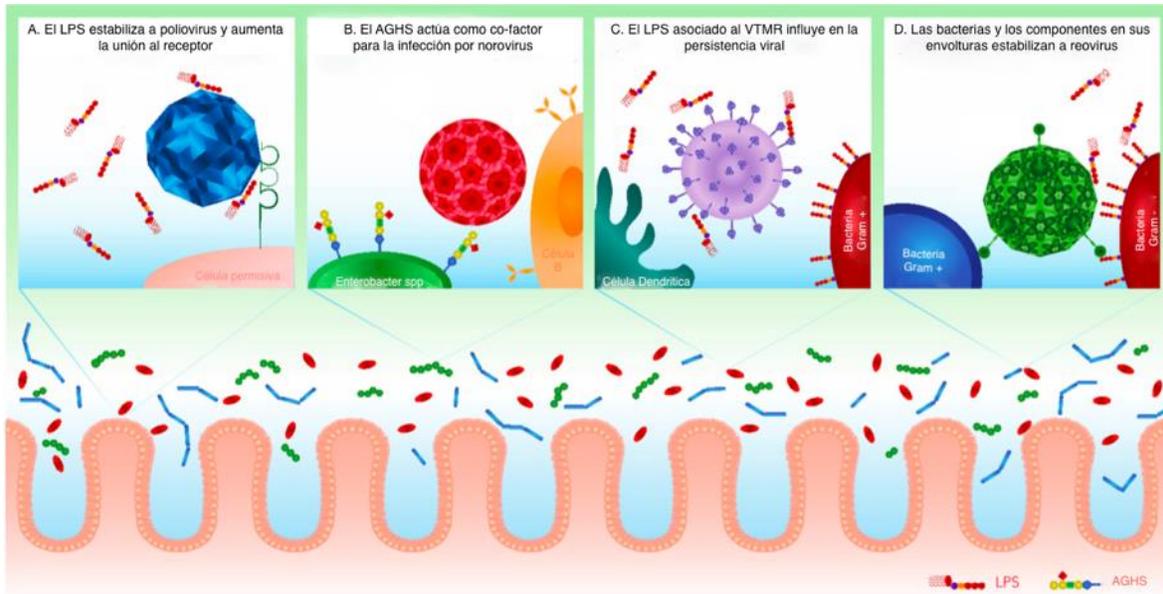
## **2.1 Microbiota y su asociación con infecciones virales**

Los virus entéricos encuentran un sin número de entornos a su paso por el tracto gastrointestinal hasta llegar a su sitio blanco. La interacción de estos con la microbiota del huésped puede afectar el resultado de la infección, pudiendo favorecerse su entrada y replicación, o bien afectando lo anterior debido a la ausencia de poblaciones bacterianas. Los efectos de las bacterias sobre la biología del virus son diversos, pudiendo afectar también las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas para la infección, incluidas la producción de anticuerpos e interferón. Los mecanismos de interacción virus – bacteria han sido poco estudiados, pero recientemente se ha reportado que algunos virus parecen verse beneficiados con la presencia de poblaciones bacterianas. A través de la participación de las bacterias de la microbiota y componentes bacterianos, los virus han desarrollado una variedad de estrategias para alterar el resultado de la infección, favoreciendo la generación de nueva progenie viral (17).

Varios virus entéricos que se benefician de las poblaciones bacterianas se unen a polisacáridos de la superficie bacteriana que les ayudan a tener una mejor infectividad, o bien en el caso de las bacterias gram negativas. Todas estas acciones culminan en una tolerancia del huésped al virus, replicación viral y transmisión (17).

Poliovirus es un virus entérico cuya infectividad se ve afectada en ausencia de bacterias de la microbiota, la adición de LPS en cultivo celular mostró estabilizar la cápside resultando en una mayor unión a las células huésped aun cuando la temperatura se aumentó hasta los 49°, mientras que la estabilidad de su cápside disminuyó, desnaturalizándose cuando la temperatura aumentaba por encima de los 46°C liberando el ARN contenido en su interior. En el caso de Norovirus utiliza los antígenos de grupo histo-sanguíneo producidos por las bacterias entéricas para unirse e infectar productivamente a las células B, el tratamiento antibiótico con ampicilina y vancomicina a ratones antes del reto con norovirus disminuye la infectividad, aunque el mecanismo de interacción no es del todo claro, se sugiere que los glicanos producidos por bacterias entéricas son necesarios para una infección eficaz. La infección por el virus de tumor mamario de ratón se da durante la etapa de lactancia por parte de ratonas infectadas a sus crías, por lo que el intestino tiene un papel clave en el establecimiento, persistencia y transmisión del mismo, pues ahí infecta a las células dendríticas que funcionan como reservorio del virus hasta la propagación del mismo a las células epiteliales mamarias, los lipopolisacáridos de las bacterias en la envoltura del tumor mamario de ratón promueven un ambiente tolerogénico que permite el establecimiento y la persistencia viral, pues es utilizado como una capa protectora para evadir la respuesta inmune. En el caso de Reovirus este se une a las bacterias Gram negativas y Gram positivas a través de los componentes de la envoltura bacteriana como LPS y péptido glicano para mejorar la termoestabilidad del virión, cuando reovirus fue incubado en cultivo celular en ausencia de estos elementos de la

microbiota los viriones disminuyeron su capacidad de unirse a las células blanco. (Figura 2) (17,19).



**Figura 2. Interacciones entre bacterias y virus.** Los virus entéricos interactúan con las bacterias de la microbiota intestinal para facilitar la infección. A) Poliovirus utiliza el LPS (lipopolisacárido) para aumentar su termo estabilidad mejorando la unión a su receptor. B) Las bacterias que expresan el antígeno del grupo histosanguíneo (AGHS) facilitan la infección de células B por Norovirus humano. C) El virus de tumor mamario en ratas al unirse al LPS bacteriano resulta en la producción de IL-10 que permite la infección viral persistente. D) Reovirus en presencia de LPS o PG ( peptidoglicano ) mejora la termo estabilidad del virión aumentando la posibilidad de infectar a las células blanco (17).

Los virus de camino hacia su nicho por el tracto gastrointestinal se encuentran diversos ambientes con pH, enzimas y poblaciones bacterianas características, si bien solo 100 partículas virales son suficientes para montar una infección las bacterias de la microbiota podrían ser un vehículo que permita una rápida introducción a la célula o un bloqueo hacia ella (19).

Los virus entéricos tienen relaciones funcionales con el resto de los constituyentes de la microbiota intestinal, los datos emergentes indican que estos virus pueden regular y ser regulados por estos otros componentes a través de una serie de procesos llamados “interacciones transkingdom” (19). Estas interacciones con otros microorganismos y con el sistema inmune son ahora reconocidas como un aspecto importante de la infectividad y la replicación.

Para evaluar estas interacciones Transkingdom (virus - microbiota) se han usado modelos murinos, en los cuales, mediante el uso de animales libres de gérmenes o de tratamientos antibióticos para el agotamiento de bacterias intestinales se ha aportado evidencia convincente de como esto influye en el establecimiento y desarrollo de la infección viral (19).

Este complejo sistema de interacciones entre los virus, bacterias, el huésped y el medio ambiente podrían estar determinando la eficacia de la replicación viral, el desarrollo de la enfermedad y la transmisión.

La comprensión de la interacción entre virus y el resto de los elementos de la microbiota podría permitir no solo entender los mecanismos de evasión de la respuesta inmune o del establecimiento de la infección, si no también el desarrollo de terapias para su tratamiento.

## **2.2 Rotavirus**

### **2.2.1 Epidemiología de rotavirus**

Las infecciones virales gastrointestinales son uno de los mayores retos en salud pública, debido a su alta morbilidad y mortalidad en la población mundial, según la OMS las enfermedades diarreicas son la segunda mayor causa de muerte en niños menores de 5 años, mismas que provocan el deceso de 525,000 de un total de 1700 millones de niños que enferman cada año (20).

Así mismo se estima que 215,000 niños infectados con rotavirus murieron en 2013, cifra que representa el 37% de las muertes por diarrea en el mundo, de estos fallecimientos el 92% ocurrieron en países de ingresos bajos y bajos medianos (21). Con base en datos de la Encuesta de Salud y Nutrición 2012 del INSP en México existe una prevalencia de enfermedades diarreicas agudas del 11% en ese mismo grupo de edad (22).

En países de bajo desarrollo, los niños menores de 5 años sufren en promedio 3 episodios diarreicos al año, en los cuales debido a la mala absorción consecuencia de la enfermedad diarreica ven disminuido su aporte nutrimental, que aunado a la baja disponibilidad de alimentos y agua potable, deriva en una desnutrición que a

su vez los hace más propensos a padecer constantemente enfermedades gastrointestinales (23).

Rotavirus es la causa más común de enfermedad diarreica, y responsable del 5% de muerte infantil en todo el mundo, esto debido entre otros factores a la falta de vacunación por servicios de salud deficientes o inaccesibles, condiciones insalubres o poca disponibilidad de agua potable (24). Como se mencionó anteriormente, este virus infecta las células epiteliales de las vellosidades del intestino delgado, utilizando la maquinaria de dichas células para lograr su replicación y posterior infección de células adyacentes, provocando lisis celular, atrofiando con esto las vellosidades intestinales, Lo anterior se traduce en una deficiente o nula absorción de nutrimentos, así como una pérdida de agua y electrolitos en las heces líquidas, vómitos, respiración y sudor (25,26).

Siendo la deshidratación la causa de muerte infantil en gastroenteritis agudas, la rehidratación oral e intravenosa sigue siendo el principal tratamiento para mantener el balance electrolítico en pacientes con enfermedad diarreica por rotavirus (27).

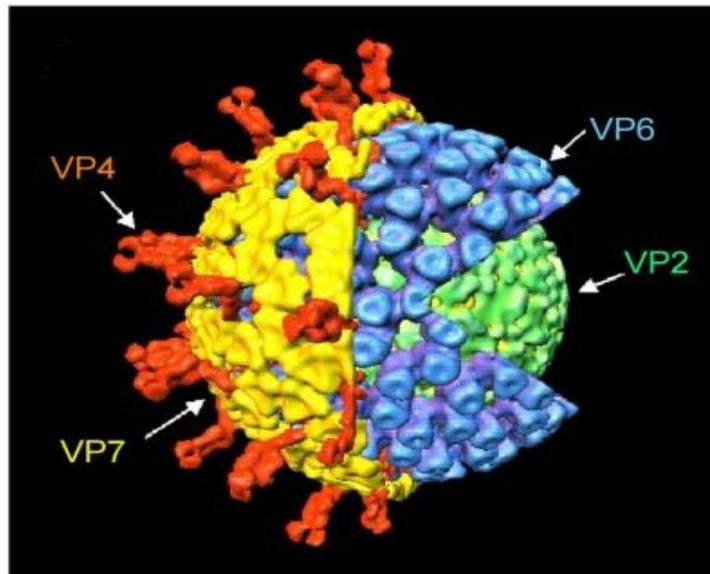
Además de lo antes mencionado, se ha encontrado que derivado de la malabsorción de nutrimentos a nivel intestinal se estima que las infecciones entéricas con diarrea representan el 25 % de los casos de retraso de crecimiento en niños y la exposición constante a estos episodios diarreicos pueden representar hasta el 43 % de los casos de retraso del crecimiento, la asociación causal entre la malnutrición y las

enfermedades infecciosas es conocida desde hace mucho tiempo, los niños desnutridos tienen un aumento en los episodios de diarrea los cuales puede provocar una pérdida de energía exacerbada, deshidratación y la muerte (28).

### **2.2.2 Estructura**

Rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae*, es un virus icosaédrico que carece de membrana lipídica, consta de tres capas proteicas concéntricas que rodean al genoma de 11 segmentos de RNA de doble cadena, los cuales codifican para 6 proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6) y 6 estructurales (VP4, VP7, VP6, VP2, VP3 y VP1). Las proteínas no estructurales están implicadas tanto en la replicación como en la morfogénesis del virus dentro de las células infectadas y las proteínas estructurales en la conformación de la cápside del virus así como de la evasión de la respuesta inmune (figura 3) (29).

La capa externa del virus está compuesta por 780 moléculas de la proteína VP7, de la que sobresalen 60 espículas formadas por dímeros de la proteína VP4 cuya base interacciona con la capa intermedia constituida por 260 unidades de la proteína VP6, la cual se considera la más abundante e inmunogénica y rodea a la capa interna. La capa interna esta conformada por la proteína VP2 la cual contiene a las proteínas VP3 y VP1, así como a los 11 segmentos de RNAdc (30).



**Figura 3. Diagrama de la estructura de rotavirus.** Las proteínas VP4, VP7 en la capa externa, seguidas de la proteína VP6 que es considerada la capa intermedia y que a su vez está unida a VP2 siendo la capa interna donde se engloban los 11 segmentos de RNA de doble cadena que codifican para las proteínas estructurales (VP) y las no estructurales (NSP) (31).

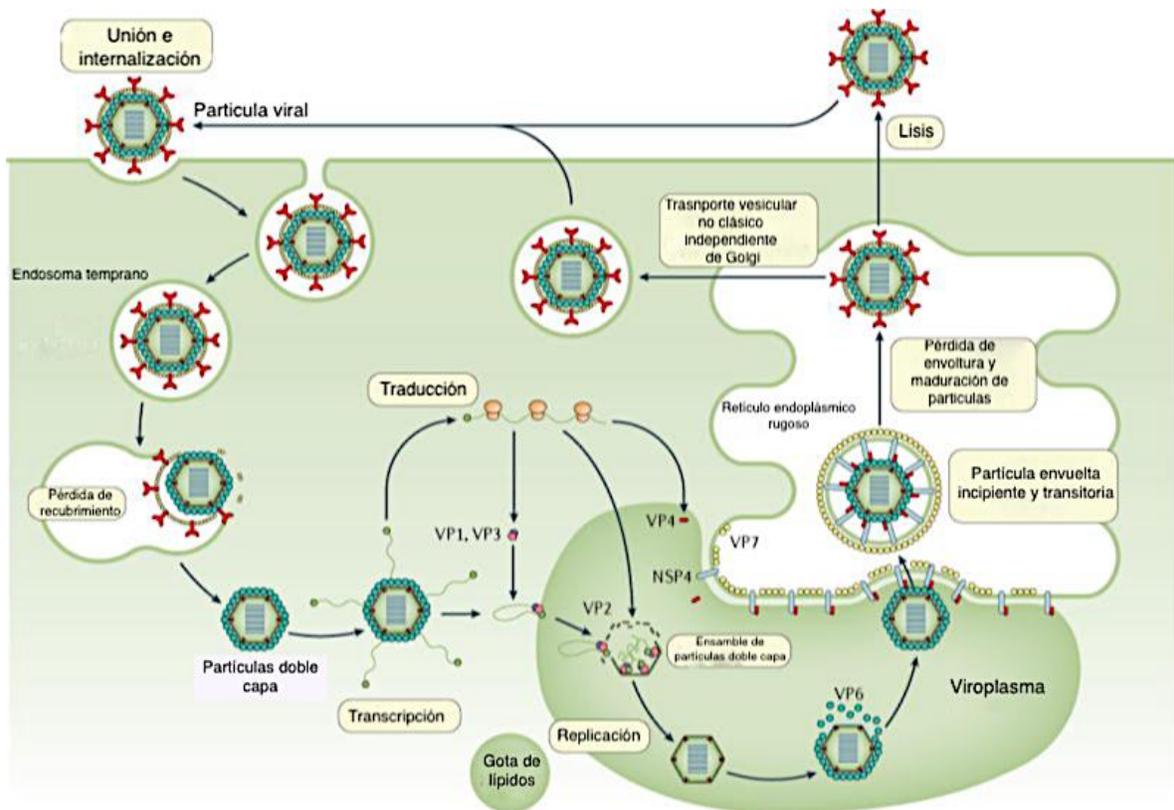
### 2.2.3 Ciclo de Replicación

Rotavirus infecta a los enterocitos maduros que se encuentran en las puntas de las microvellosidades del intestino delgado, en cuyo interior se lleva a cabo el ciclo de replicación del virus que termina con la lisis de dichas células provocando diarrea aguda y por consiguiente deshidratación debido a la malabsorción (figura 4) (30) .

Para rotavirus se han descrito varios mecanismos de entrada a la célula, como son la interacción con proteínas de choque térmico Hsc70 y la endocitosis dependiente o independiente de clatrina (32).

Una vez que el dominio VP8 de la proteína VP4 se une al receptor rotavirus se interna en la célula, donde los bajos niveles de calcio en el endosoma provocan que pierda la capa externa de la cápside conformada por las proteínas VP7 y VP4, quedando una partícula de doble capa que es transcripcionalmente activa (20).

En el citoplasma la proteína VP1 funge como polimerasa viral, dando paso a la síntesis de ARN mensajeros que al ser traducidos darán origen a las proteínas estructurales y a nuevos templados de ARNdc de la progenie viral, estas nuevas cadenas junto a las proteínas NSP2 y NSP5 forman nuevas partículas de doble capa (DLPs) formadas por VP2 y VP6. Las DLPs interaccionan a través de NSP4 con la membrana de retículo endoplásmico, donde se adicionan VP4 y VP7 constituyendo partículas maduras de triple capa que están listas para salir por medio de lisis celular, infectando a su salida a los enterocitos adyacentes (20,24).



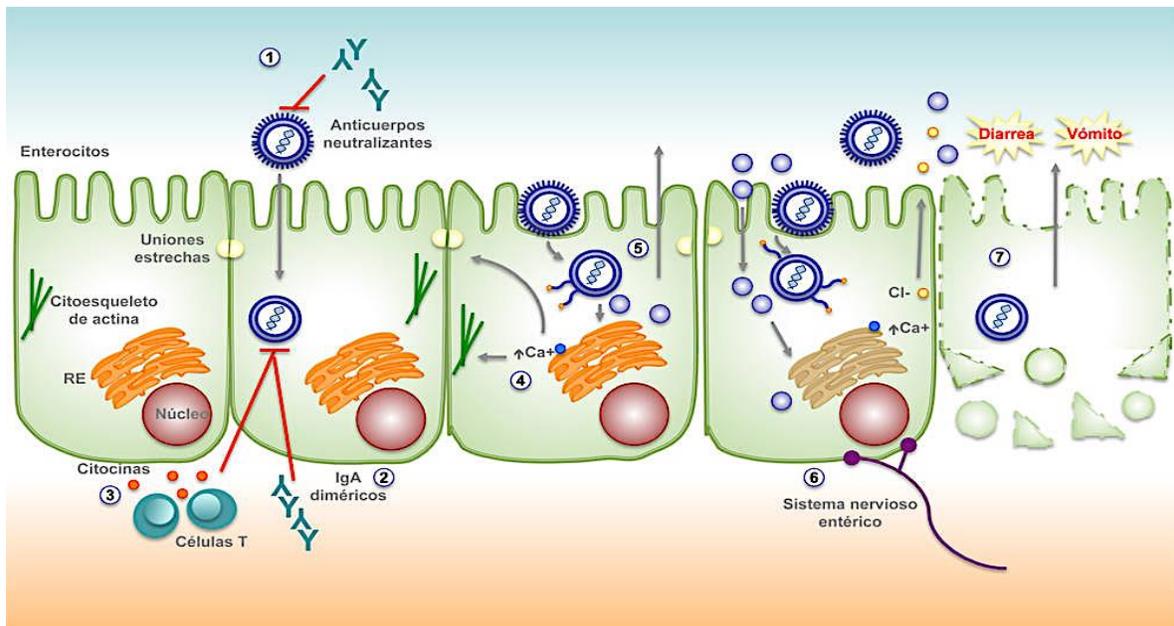
**Figura 4. Ciclo de replicación de Rotavirus.** El virus se internaliza por vías endocíticas en la célula al unirse a su receptor en la membrana por medio de la proteína VP4, los niveles bajos de calcio en el endosoma eliminan la capa externa y pierde su recubrimiento y se convierte en el citoplasma en una partícula de doble capa que es transcripcionalmente activa (DLP), el ARN replicado se empaqueta en nuevos DLPs al interior de viroplasma de donde pasan al retículo endoplásmico rugoso, sitio donde adquieren a las proteínas de la cápside externa, una vez maduras estarán listas para su salida de la célula mediante lisis (33).

Rotavirus infecta a crías de aves y mamíferos como ratones, cerdos, humanos y bovinos entre otros, algunos de estos son utilizados como modelos para el estudio de la infección y el desarrollo de vacunas (34).

#### **2.2.4 Respuesta inmune en la infección por rotavirus.**

Una vez que el enterocito es infectado por rotavirus, la célula infectada monta una respuesta innata celular mediante la producción de IFN tipo I. Esta señal es captada por las células del sistema inmune cercanas al sitio de infección, entre ellas las como son macrófagos y células dendríticas, las cuales tienen contacto con el antígeno y lo transportan a las Placas de Peyer donde son presentados a las células T vírgenes mismas que al ser activadas inician la expansión clonal de linfocitos B específicos y de linfocitos T CD8 y CD4, que viajan al ganglio linfático mesentérico y posteriormente a través del torrente sanguíneo llegan al sitio de infección para neutralizar la infección (figura 5). Una vez diferenciados, los linfocitos B bajo la estimulación de citocinas como la IL-6 e IL-4 inician la producción de anticuerpos específicos contra rotavirus (35).

Se ha descrito que las células Th de memoria específicas para VP6, pueden potenciar la protección de anticuerpos neutralizantes con especificidad para las proteínas de la capa externa de rotavirus por parte de las células B (36).



**Figura 5. Infección por Rotavirus y respuesta inmune.** 1) Rotavirus infecta a los enterocitos maduros en las puntas de las microvellosidades intestinales. 2) Las IgA actúan como medio de neutralización directa siendo la primera línea de defensa a la infección primaria. 3) CPA por acción de IFNI presentan al antígeno a las células T y B iniciando la expansión clonal 4) La pérdida de la capa exterior inicia la transcripción de segmentos de RNA que se acumulan en citosol que por acción e las proteínas NSP2 y NSP5 son internalizados en un cuerpo de inclusión o viroplasma. 6) posteriormente se adquiere la capa intermedia y finalmente en el retículo endoplásmico son agregadas las proteínas VP7 y VP4 de la capa externa. 7) Rotavirus Incrementa los niveles de calcio, provocando la salida de agua y cloruro de la célula, La partícula tricapa sale de la célula causando lisis de los enterocitos provocando malabsorción intestinal y por tanto diarrea aguda. Tomado de: <https://vanguardia.com.mx/articulo/investigacion-mexicana-avanza-en-el-entendimiento-de-la-naturaleza-del-rotavirus>

Durante la infección por rotavirus la producción de anticuerpos IgA intestinales antígeno específicas ayudan a la erradicación de la infección, dichos anticuerpos se producen de manera exponencial durante la infección siendo detectables desde el día 5 o 6 y alcanzando un pico máximo en los días 7 y 8 cuando el virus es ya indetectable gracias a esta respuesta inmune, estos anticuerpos intestinales tienen un papel importante en la resolución de la infección y en la protección a futuras reinfecciones con el mismo serotipo (37).

### **2.2.5 Vacunas contra Rotavirus**

Las vacunas como medio de prevención de enfermedades han sido una herramienta útil para disminuir la morbilidad y mortalidad en poblaciones de riesgo. Y han permitido erradicar enfermedades que antes de su desarrollo acababan con miles de vidas o dejaban secuelas de por vida (38).

Rotavirus fue una de las principales causas de gastroenteritis aguda así como de muerte infantil, situación que cambió con la creación de vacunas contra este virus, pues disminuyó la mortalidad y morbilidad en niños menores de 5 años, sobre todo en países de tercer mundo donde el acceso a servicios de salud es limitado (39).

En los países donde se introdujo la vacunación oral contra rotavirus se logró en los primeros 10 años una reducción del 67% de las hospitalizaciones en menores de 5 años asociadas a diarreas por este virus, mientras que las muertes redujeron en un 42% en el mismo periodo de tiempo (30).

Rotarix de GlaxoSmithKline desarrollada a partir de rotavirus humano y Rotateq de Merck derivada de rotavirus recombinantes humano/ bovino son las dos vacunas orales antirrotavíricas más utilizadas en los esquemas de vacunación alrededor del mundo debido a su seguridad y a la protección que confieren (40). Rotarix se administra en 2 dosis, mientras que el esquema de Rotateq consta de 3 dosis, ambas se administran antes de cumplir los 8 meses de vida y presentan pocos efectos secundarios como dolor abdominal, diarrea o vomito leves (41).

Rotarix por su parte es una vacuna oral de virus vivo atenuado desarrollada por el Dr. Richard Ward compuesta por la cepa G1P RIX4414 de rotavirus, la inmunización consiste en dos dosis entre las 6 y las 24 semanas de edad. Brinda protección contra múltiples serotipos de rotavirus disminuyendo así la morbilidad y la mortalidad asociadas a este virus (42) .

Si bien se ha demostrado que la microbiota intestinal puede modificar los resultados de la inmunización de ciertas vacunas (43), para rotavirus la evidencia es limitada.

### **2.2.6 Modelo murino de la infección por rotavirus**

El modelo murino de la infección por Rotavirus fue desarrollado por el Dr. Richard Ward en 1990. Gracias a este modelo puede estudiarse el curso de la infección natural en condiciones controladas en un tiempo relativamente corto, y determinar la producción de anticuerpos, la excreción de antígeno viral en las heces de los ratones infectados, evaluar memoria inmunológica, siendo un modelo predictivo de lo que pudiese estar ocurriendo en una infección en humanos (44).

Sin embargo, el uso de ratones adultos es mucho más conveniente pues mientras los neonatos presentan diarrea los adultos cursan la infección de forma asintomática, pero en ambos es posible evaluar los elementos de la respuesta inmune que participan en la eliminación del virus, así como los demás factores que favorecen a la infección, antes, durante y posterior a la infección, convirtiéndolo en un modelo predictivo de lo que ocurre en una infección en humanos (37).

### **2.3 Participación de la microbiota en la modulación de la respuesta inmune y la producción de anticuerpos.**

El epitelio intestinal, esta conformado por una capa de células únicas que compone la barrera entre el ambiente estéril del hospedero y el lumen intestinal rico en bacterias. En el intestino existen células especializadas en la producción de moco, el cual es importante para mantener la integridad de la monocapa, además de ser una barrera para impedir el contacto directo de las bacterias con las células epiteliales, pero manteniendo una estrecha comunicación entre ambos ambientes. Los enterocitos mantienen la homeostasis de la mucosa intestinal mediante la expresión receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR's) que activan a la respuesta inmune innata, además de secretar péptidos antimicrobianos que permiten modular a la microbiota (45).

El tracto gastrointestinal es el sitio primario de interacción entre el sistema inmune y los microorganismos. Algunas asociaciones huésped - bacterias han creado un ambiente mutualista con beneficios para ambas partes, entre los cuales pareciera que algunas funciones del sistema inmune dependieran de estas interacciones (46). Si bien se sabe que el sistema inmune tiene como función proteger de patógenos microbianos éste coexiste pacíficamente con la compleja microbiota, la cual incluye bacterias y virus potencialmente patógenos, sin embargo, bajo condiciones de

eubiosis, estos microorganismos participan en diversas funciones metabólicas e inmunológicas necesarias para el bienestar de nuestro organismo.

El mantenimiento de la respuesta inmune intestinal, y en general en las mucosas, es un proceso complejo y coordinado de respuestas tanto innatas como adaptativas, la falta de regulación en estas puede llevar al desarrollo de patologías como alergias, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias intestinales entre otras, por lo tanto la microbiota es un componente esencial para mantener en óptimas condiciones de respuesta al sistema inmune, ya que las bacterias comensales capacitan o entrenan a las células epiteliales y a las del sistema inmune a responder a desafíos infecciosos, esto es posible gracias a que las bacterias de la microbiota interactúan con las células epiteliales y las del sistema inmune a través de ligandos que son reconocidos por los PRR's, lo que les permiten responder rápidamente ante los encuentros con organismos patógenos(47,48).

Es por ello que resulta de gran importancia mantener a la microbiota intestinal en un estado de eubiosis que permita al sistema inmune responder de manera correcta a los estímulos tanto de patógenos como de bacterias comensales, lo cual ayuda a su vez a conservar la salud del hospedero (45).

## **2.4 Uso de antibióticos durante infecciones virales.**

En la actualidad existen varios estudios que afirman que el uso de antibióticos influye sobre la duración y la severidad de las infecciones virales. En el 2014, Uchiyama *et al.* (12), realizaron un estudio en donde ratones neonatos libres de gérmenes o tratados con neomicina y ampicilina por vía oral, fueron más resistentes a la infección por rotavirus, demostrando que las bacterias comensales influyen sobre la infección viral, actuando principalmente en la entrada del virus y no en su replicación. En este mismo estudio, los ratones tratados con antibióticos mostraron un incremento significativo en la producción de IgA's intestinales específicas contra rotavirus infiriendo que algunas poblaciones bacterianas modulan la respuesta inmune intestinal y que su eliminación favorece una mejor respuesta inmune específica. Sin embargo, en la actualidad no existen más estudios que corroboren o refuten la interacción existente entre las bacterias comensales y la infección por rotavirus.

El efecto de los antibióticos disminuye la riqueza taxonómica de la comunidad microbiana del intestino, pero esta parece restablecerse al finalizar el tratamiento farmacológico, regresando a un estado eubiótico después de cierto tiempo (49). El tratamiento con antimicrobianos es una intervención importante en el control de infecciones gastrointestinales de origen bacteriano, ya que al administrarse reducen

la duración e intensidad de los síntomas, además de prevenir complicaciones y lo más importante disminuyen la transmisibilidad (50).

A continuación, se describen algunos de los antibióticos utilizados en diarreas agudas de etiología bacteriana y/o viral:

#### **2.4.1 Nitazoxanida**

La Nitazoxanida es un agente antimicrobiano tiazólico de amplio espectro con efectos sobre bacterias anaerobias, protozoos y virus. Actúa sobre los organismos anaeróbicos interfiriendo con el metabolismo de energía de los mismos, mientras que su mecanismo de acción con los virus se dirige a las vías celulares implicadas en la síntesis de proteínas virales (51).

Una parte de la Nitazoxanida pasa a circulación y la otra permanece en el intestino donde realiza su acción antimicrobiana intraluminal. Debido a que no inhibe las enzimas del citocromo P450 no tiene interacciones con otros medicamentos. Su metabolito activo, la tizoxanida, alcanza la concentración plasmática máxima a 3 horas de su administración, para finalmente ser excretada en la bilis por medio de las heces y también por orina (52).

Varios ensayos clínicos han demostrado ya la efectividad de Nitazoxanida en el tratamiento de la colitis por *Clostridium difficile* y de igual forma en la gastroenteritis por rotavirus inhibiendo la replicación del mismo en las células intestinales, disminuyendo la carga viral y los síntomas, así como el tiempo de hospitalización en pacientes (53).

Terán *et al.* en 2009 (54), realizaron un estudio en el que compararon los efectos de la Nitazoxanida contra los de un probiótico en el tratamiento de diarrea por rotavirus en niños bolivianos, encontrando que este antibiótico mejoró el estado de salud de los niños reduciendo la duración de la diarrea, aportando así evidencia sobre el papel de los antibióticos en las infecciones virales.

#### **2.4.2 Neomicina**

La Neomicina es un antibiótico perteneciente al grupo de los aminoglucósidos, actúa como bactericida contra un gran número de agentes bacterianos Gram negativos, a diferencia de los Gram positivos con los cuales su efectividad es mínima, inhibe la síntesis de proteínas bacterianas interfiriendo con la iniciación del ARN mensajero, resultando en proteínas anormales o no funcionales, lo cual evita la replicación y por ende, la proliferación bacteriana (55).

Este antibiótico se administra por vía oral para el tratamiento de infecciones gastrointestinales, así como por vía tópica para el tratamiento de dermatitis.

Después de su distribución y metabolismo finalmente se excreta por heces. Uno de sus efectos adversos más importantes es la ototoxicidad razón por la cual no debe administrarse vía parenteral (56). La Neomicina suele ser uno de los antibióticos utilizados en terapias combinadas junto a la Ampicilina, Amoxicilina o Metronidazol, para el tratamiento de diarreas agudas debido a que ha demostrado disminuir la duración de las infecciones gastrointestinales.

Un estudio realizado por Uchiyama *et al.*, se buscaba evaluar la carga viral en ratones infectados por rotavirus a los cuales se les había dado un tratamiento previo con este antibiótico y ampicilina vía oral durante 7 días, logrando con esto una disminución de las poblaciones bacterianas en intestino y como consecuencia una disminución de la cantidad virus excretado en heces (12).

### **2.4.3 Ampicilina**

Ampicilina es un antibiótico de amplio espectro, se trata de una penicilina semisintética derivada de la penicilina básica, indicada en el tratamiento de infecciones gastrointestinales causadas por microorganismos como *E. coli*, *shigella*, y *enterococos*. Actúa inhibiendo la última etapa de síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a proteínas receptoras de la misma, al impedir que la pared celular se forme correctamente ocasiona la lisis de la bacteria. Es un antibiótico de absorción sistémica, con una vida media plasmática de 1 a 2 horas para finalmente ser excretada por orina y heces (57).

Debido a la resistencia bacteriana resultado del uso indiscriminado de antibióticos sin prescripción médica la Ampicilina puede usarse en combinación con otros antibióticos para mejorar su acción bactericida (58).

Se ha reportado su uso en diversos estudios para eliminar bacterias de la microbiota temporalmente, tal como lo hicieron Castro-Mejía *et al.* (59), quienes administraron ampicilina por 48 horas en el agua *ad libitum* para evaluar el tiempo de restablecimiento de la microbiota, encontrando que si bien con el tratamiento la riqueza taxonómica del intestino se veía afectada 4 semanas después a pesar de estar en aisladores las bacterias del intestino regresaban a su estado previo al tratamiento.

#### **2.4.4 Rifaximina**

La Rifaximina es un antibiótico oral semisintético de amplio espectro contra bacterias gram positivas y gram negativas aeróbicas y anaeróbicas, derivado de la Rifamicina S auxiliar en el tratamiento de infecciones gastrointestinales, encefalopatía hepática y enfermedades inflamatorias intestinales(60).

Ejerce su actividad bactericida impidiendo la síntesis de RNA bacteriano, lo cual podría estar relacionado con el efecto pleiotrópico antiviral (49). Su característica

más importante es su absorción luminal, debido a su mínima absorción alcanza una concentración muy alta en la luz intestinal (8,000mcg/g de heces), lo cual le confiere propiedades como su mínima resistencia bacteriana debido a que tiene una baja absorción sistémica y los efectos mínimos sobre la conformación de la microbiota intestinal, actuando de manera casi directa contra bacterias patógenas (49).

Un antibiótico con estas características puede inducir cambios eubióticos en la biodiversidad bacteriana del intestino, representando una ventaja terapéutica en padecimientos específicos disminuyendo los efectos tóxicos que solían presentarse con antibióticos de absorción sistémica (61).

La Rifaximina es capaz de alterar la virulencia y la translocación bacteriana, tiene propiedades antiinflamatorias, como lo reportaron Soldi *et, al.* en 2015, el uso de Rifaximina fue eficaz en el alivio de los síntomas del síndrome de intestino irritable estimulando la reorganización microbiana influyendo principalmente en bacterias perjudiciales como *Clostridium* y *Escherichia*, favoreciendo el desarrollo de *F. prausnitzii* que es capaz de tener un impacto positivo en la homeostasis del intestino mediante la producción de butirato que funge como alimento para las células del colón y por inducir procesos antiinflamatorios (62,63).

### 2.4.5 Nifuroxazida

Nifuroxazida es uno de los antibióticos lumbinales más usados en casos de diarreas agudas, actúa como un bacteriostático solo a nivel de la mucosa intestinal por lo cual puede ser considerado antiséptico, se trata de un derivado de nitrofurano y es el único de estos que no difunde hacia otros tejidos o sistemas (64). Se ha demostrado que gram positivos como *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus pyogenes* y enterobacterias gram negativas como *E. coli*, *Salmonella sp.* y *Shigellae sp.* son susceptibles a este fármaco (64).

Las propiedades antimicrobianas y antiparasitarias de este fármaco se deben a que impide la formación de enzimas bacterianas implicadas en la degradación aeróbica y anaeróbica tanto de la glucosa como del piruvato, por tanto bloquea el metabolismo bacteriano ocasionando la muerte de estos microorganismos (65).

La evidencia del uso de este antiséptico intestinal en el mantenimiento o restablecimiento de la eubiosis al eliminar a patógenos que pudieran estar alterando este equilibrio entre las bacterias comensales es limitado, se ha utilizado para modular la microbiota intestinal y sus efectos sobre el síndrome de intestino irritable y la enfermedad de Crohn (64), razón por la cual se convierte en candidato de nuestro experimento debido a su acción local que se asemeja a la de Rifaximina y que nos permitirá tener un punto de comparación.

#### 2.4.6 Vancomicina

Vancomicina es un bactericida perteneciente al grupo de los glucopéptidos de espectro reducido, ya que actúa sobre las bacterias gram positivas inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana de estos, sin embargo, el tamaño de la molécula no permite su paso por la membrana externa de bacterias gram negativas lo cual le impide ejercer su acción sobre estas (66).

Su estructura química dificulta también su paso a través de las membranas celulares y los tejidos, así mismo cuando se administra por vía oral presenta baja absorción. Este bactericida es metabolizado por el hígado y excretado en su mayoría por la orina en un lapso de 3 a 9 horas después de su administración (67).

Es un antibiótico utilizado comúnmente en el área hospitalaria bajo estricta supervisión médica debido al riesgo de nefrotoxicidad y a que es utilizado en infecciones bacterianas en sustitución de antibióticos que han generado alta resistencia(66). Se ha demostrado la eficacia de este medicamento contra estafilococos, estreptococos y enterococos (67).

Vancomicina está indicada principalmente para tratar infecciones graves como la sepsis o endocarditis producidas por *S. Aureus* , así como la enterocolitis y la colitis pseudomembranosa a causa de *Clostridium difficile* (67).

Estudios recientes han demostrado que la administración de Vancomicina vía oral para tratar infecciones por *C. difficile* originan pérdida de la diversidad bacteriana de

la microbiota intestinal, afirmando con base al seguimiento de pacientes tratados con dicho antibiótico que la riqueza taxonómica del intestino podría tardar hasta 31 meses en restablecerse (68).

Con base en esta evidencia se podría afirmar que Vancomicina por su espectro reducido podría ayudar a modificar la microbiota intestinal de manera un tanto selectiva para determinar la función de ciertas bacterias y de manera casi completa si se administra con otros antibióticos en el establecimiento de infecciones de origen viral en el tracto gastrointestinal.

### **2.5.7 Metronidazol.**

Metronidazol es un bactericida de amplio espectro que mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) altera la estructura del ADN, inhibiendo así la síntesis de ácidos nucleicos y por consecuencia la muerte bacteriana (69).

Su metabolismo es hepático, pero tiene una amplia distribución a nivel sistémico en tejidos y su vida media en circulación es de 6 a 8 horas, posteriormente se excreta por heces y orina, actúa sobre bacterias anaerobias y protozoos, se ha registrado su uso en infecciones por *B. Fragilis*, *Clorstridium* sp, *Clostridium difficile* así como por *Entamoeba histolitica* y *Giardia lamblia* (70).

Junto a la Vancomicina es el fármaco de primera elección para el tratamiento por *C. difficile* en casos moderados, y actualmente es de los medicamentos más efectivos

en el manejo de infecciones por bacterias anaerobias gram positivas y negativas, como es el caso de *H. pylori* que se encuentra en la mucosa del estómago humano y cuya presencia se relaciona con el desarrollo de úlceras gástricas (71) .

Se ha reportado su uso en ensayos para irrumpir la microbiota intestinal y determinar así el impacto de estas modificaciones sobre la respuesta inmune innata en la endotoxemia en sujetos sanos, donde los resultados no mostraron diferencias significativas en cuanto a la producción de citocinas y anticuerpos en comparación con los sujetos sin tratamiento antibiótico previo a la endotoxemia, mientras que las poblaciones bacterianas si se veían afectadas(72).

En un estudio realizado en 2018 por Haak *et al.*, se reporta que el uso de metronidazol por un periodo de 7 días en individuos sanos indujo a un estado disbiótico alterando las poblaciones bacterianas residentes del intestino, y que incluso meses después de haber suspendido el tratamiento las poblaciones bacterianas no se restablecían a su estado pre tratamiento (68).

### **2.5.8 Ciprofloxacina**

Ciprofloxacina es considerado un bactericida de amplio espectro pues actúa sobre gram positivos y gram negativos, incluyendo enterobacterias, cocos y bacilos. Se metaboliza en hígado y se excreta por orina (73). Debido a las bajas concentraciones que alcanza en suero no es usado como antibiótico sistémico, se

utiliza en el tratamiento de enfermedades respiratorias como bronquitis aguda, infecciones de vías urinarias, quemaduras, bacteriemia, así como profilaxis en pacientes inmunosuprimidos (74).

Ciprofloxacina actúa sobre la girasa impidiendo el superenrollamiento de ADN bacteriano, de esta manera bloquea la replicación de dicho material genético y por ende la proliferación bacteriana (73).

Este antibiótico tiene efectos determinantes en la composición de la microbiota, como lo reportaron en 2008 Dethlefsen *et al.*, quienes después de un tratamiento con dicho antibiótico encontraron que la taxonomía de la microbiota se modificaba abruptamente, pero después de 4 semanas se recuperaba casi por completo, a su vez encontraron que si el tratamiento se repetía la recuperación de las bacterias no era completa como en la primera ocasión (75). Los efectos agudos de los antibióticos sobre la microbiota intestinal durante el tratamiento de una infección gastrointestinal, podría modificar las poblaciones bacterianas existentes de manera permanente, estas modificaciones podrían tener como consecuencia efectos inmunológicos y metabólicos posteriores.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que la composición de la microbiota participa de manera importante en el establecimiento y desarrollo de enfermedades, así como en el mejoramiento del estado de salud del hospedero. Poco se sabe de las interacciones entre las bacterias y los virus eucariontes causantes de infecciones en el intestino y de cuáles son los componentes que participan en el desarrollo de estas infecciones. Se ha descrito que algunas infecciones virales intestinales causadas por Norovirus y Reovirus se favorecen con la presencia de ciertas poblaciones bacterianas y/o algunos elementos bacterianos como el LPS y que, al eliminar estos elementos, el curso y la duración de la infección se ven disminuidos.

En el modelo murino por rotavirus solo se han evaluado la Neomicina y Ampicilina, mostrando una disminución de la cantidad de virus excretado, así como de un incremento en la producción de anticuerpos específicos contra rotavirus, sugiriendo que la descarga de bacterias mejora la respuesta inmune intestinal. Sin embargo, se desconoce el mecanismo específico involucrado. Por esta razón, en el presente trabajo decidimos evaluar dos antibióticos luminales de amplio espectro utilizados en diarreas agudas, así como también antibióticos parenterales de amplio espectro. Este proyecto pretende aportar evidencias de la interacción entre las bacterias comensales y rotavirus, mediante la modificación de las poblaciones bacterianas y determinar de esta manera si la ausencia de estas tiene impacto en el desarrollo de la infección y sobre la respuesta inmune hacia ellos.

#### **4. HIPÓTESIS.**

La microbiota intestinal es determinante en el curso de la infección por rotavirus en un modelo murino, así como en la respuesta inmune protectora inducida hacia una vacuna oral monovalente.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

Determinar la participación de la microbiota intestinal en la infección por Rotavirus, así como su influencia en la respuesta inmune inducida por la vacuna oral monovalente contra rotavirus.

### **5.1 Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto de un tratamiento oral con antibióticos de amplio espectro sobre la replicación de rotavirus.
2. Evaluar el efecto de un tratamiento intraperitoneal con antibióticos de amplio espectro sobre la replicación de rotavirus.
3. Determinar la producción de IgA's intestinales e IgG's totales específicas contra rotavirus en ratones con o sin tratamiento antibiótico.
4. Verificar la disminución de colonias bacterianas presentes en las heces de ratones con o sin tratamiento antibiótico.
5. Evaluar la respuesta inmune inducida por la vacuna oral monovalente en ratones tratados con antibióticos.
6. Analizar la morfología del intestino delgado en ratones tratados con antibióticos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1 Ratones

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de 6-8 semanas de edad, libres de patógenos, procedentes del bioterio del Instituto de Biotecnología-UNAM, los cuales se mantuvieron en un ambiente estéril en las instalaciones del mismo instituto, a una temperatura constante de 26°C, en aisladores bajo ciclos de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad. Agua y alimento fueron proporcionados *ad libitum*. Se conformaron grupos de 5 animales por cada condición experimental.

### 6.2 Virus

#### ***Rotavirus murino EDIM***

Los ratones BALB/c fueron infectados con el rotavirus murino EDIM (del inglés *epizootic diarrhea of infant mice*). En nuestro laboratorio, EDIM se amplificó en ratones neonatos de la cepa C57 de 3 días de nacidos, los cuales fueron infectados con  $1 \times 10^4$  unidades formadoras de focos (uff), a los 5 días post infección (p.i) fueron sacrificados por dislocación para coleccionar los intestinos delgados, los cuales se homogeneizaron en TNC (10mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>). El homogeneizado obtenido fue alicuotado y almacenado a -80°C, para ser utilizado como inóculo en infecciones posteriores.

### 6.3 Antibióticos.

Para los antibióticos administrados vía intraperitoneal, se realizaron dos cocteles, la dosificación se realizó utilizando una relación gramos de medicamento por kilogramo de peso. La composición de las mezclas de antibióticos se reporta en las tablas 1 y 2. Ambas mezclas fueron administradas vía intraperitoneal por 3 días previo a la infección.

Tabla 1.

Coctel 1	
Antibiótico	Dosis
<b>Vancomicina</b> Solución inyectable Laboratorios Pisa Lote: W17NO21 Cad: NOV 2019	50 mg/kg
<b>Metronidazol</b> Solución inyectable Laboratorios Senosian Lote: S8F829 Cad: JUN 2020	5 mg/kg
<b>Ciprofloxacino</b> Solución inyectable Laboratorios Fresenius Kabi Lote: 73M9E0192 Cad: MAY 2021	25mg/kg

Tabla 1. **Cóctel 1 de antibióticos.** Se enlistan los antibióticos que componen el coctel 1 administrados durante 3 días vía intraperitoneal para la modificación de la microbiota intestinal.

Tabla 2.

Coctel 2	
Antibiótico	Dosis
<p><b>Ampicilina</b>                      Solución inyectable                      Laboratorios GoldBio                      Lote: 5118.032818A                      Cad: ENE 2021</p>	<p>100 mg/kg</p>
<p><b>Neomicina</b>                      Solución inyectable                      Laboratorios GoldBio                      Lote: 0704.031418A                      Cad: JUN 2021</p>	<p>20 mg /kg</p>

**Tabla 2. Cóctel 2 de antibióticos.** Se enlistan los antibióticos que componen el coctel 2 administrados vía intraperitoneal, reportados por Uchiyama *et al.* en 2014 (12), utilizados para la modificación de la microbiota intestinal.

En el experimento de antibióticos lumbinales, se administraron Rifaximina, además de Nifuroxazida y Ampicilina, los cuales fueron administrados vía oral durante 7 días antes del reto y/o durante la infección con el rotavirus EDIM. Los ratones fueron inoculados con 100  $\mu$ L de los antibióticos en la dosis mencionada utilizando una cánula gastroesofágica. Las características y dosis de los antibióticos orales se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3.

Antibióticos orales	
Antibiótico	Dosis
<p><b>Rifaximina</b>                      Suspensión oral                      Laboratorios Alfa Wasserman                      Lote: 15586                      Cad: FEB 2020</p>	100 mg/kg
<p><b>Nifuroxazida</b>                      Suspensión oral                      Laboratorios Degort's chemical                      Lote: 644N                      Cad: SEP 2020</p>	100 mg/kg
<p><b>Ampicilina</b>                      Suspensión oral                      Laboratorios Novag                      Lote: 320038                      Cad: ABR 2020</p>	100 mg/kg

Tabla 3. **Antibióticos orales.** Se enlistan los antibióticos orales de amplio espectro utilizados para la modificación de la microbiota intestinal.

#### 6.4 Infección de ratones BALB/c con EDIM

Los ratones fueron infectados con un homogeneizado de intestinos de ratón neonato infectado con el rotavirus EDIM, se utilizaron aproximadamente  $10^4$  uff diluido 1:1000 en 100  $\mu$ L de medio DMEM libre de suero utilizando una cánula gastroesofágica para su administración. Previo a esto, se administraron 100  $\mu$ L de bicarbonato al 1.33% por vía oral con el fin de neutralizar el pH ácido del estómago y asegurar la infección, lo cual se corroboró al analizar las heces colectadas mediante un ensayo ELISA.

## **6.5 Toma de muestras**

### **6.5.1 Heces**

Para todos los ensayos se colectaron las heces de cada uno de los ratones previo a la infección y durante los siguientes 8 días, periodo que dura la excreción del virus en las heces. Las heces fueron rotuladas y almacenadas en tubos eppendorf de 1.5 ml inmediatamente después de su recolección a -20 °C hasta su disgregación. Posteriormente, las muestras se utilizaron en la realización de ensayos ELISA para determinar la carga de viral en el curso de la infección, así como la producción de IgA's específicas contra rotavirus.

### **6.5.2 Sueros**

Se tomaron 500 µL de muestras de suero sanguíneo realizando un corte transversal en la cola 14 días después del día de infección, las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 8000 rpm, al finalizar se tomó la fase sérica de las muestras y se almacenaron en tubos eppendorf de 1.5 ml a -20°C para su posterior utilización en la realización de ensayos ELISA con la finalidad de determinar la cantidad de anticuerpos séricos de tipo IgG específicos contra rotavirus.

## **6.6 ELISA de captura para determinar la carga viral de antígeno viral en heces**

Las muestras de heces recolectadas durante los días del experimento fueron diluidas al 5% (peso/ volumen) en una solución amortiguadora (10mM de Tris pH 7.4, 100 mM de NaCl, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 5% de Suero Fetal Bovino, 0.05% de Tween y 10 mM de NaN<sub>3</sub>) durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente los tubos que contenían las muestras fueron sometidos a agitación en vortex para lograr la disgregación total de las heces y con ello la liberación total de las partículas virales contenidas en ellas, la suspensión fue obtenida al centrifugar las muestras a 13000 rpm durante 5 minutos.

Para el análisis de la carga viral se realizó una prueba ELISA de captura, placas de 96 pozos (Costar, High Binding) se incubaron con el anticuerpo policlonal de cabra contra rotavirus (CABRAX) diluido 1:5000 en PBS durante 14-16 horas a 4°C.

Después las placas se lavaron dos veces con TNC (10 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) con 0.05% de Tween 20, enseguida la placa se bloqueó con 5% de leche descremada Carnation en polvo disuelta en TNC-Tween 0.05% por dos horas a 37°C.

Enseguida se lavaron las placas con 150 µL/pozo de TNC-Tween 0.05% 2 veces y se agregaron los SN de las heces por duplicado de acuerdo con el mapa diseñado, para ser incubadas las a 37°C por 2 horas.

Las placas se lavaron por 4 veces con TNC Tween 20 0.05%, y se agregó un anticuerpo policlonal hiperinmune contra RV de simio de la cepa RRV producido en conejo diluido 1:2000 en la solución de TNC-Tween 0.05% con 5% de leche descremada Carnation y se incubaron por una hora a 37°C.

Enseguida se lavaron las placas 4 veces con TNC tween 20 0.05% y se añadió un anticuerpo policlonal de cabra anti IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina 1:2000 diluido en TNC-Tween 0.05% con 5% de leche descremada Carnation, las placas se incubaron por una hora a 37°C. Finalmente se añadió el sustrato p-nitrofenil fosfato disódico y las placas se incubaron por 1 hora a 37°C y a los tiempos 30, 45 y 60 se tomaron las lecturas de absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro Multi Skan 352 (LabSystems).

## **6.7 ELISA para determinar la producción de IgA intestinales específicas contra rotavirus.**

Para determinar la producción de IgA's resultantes de la infección se realizó una prueba ELISA de captura, en la cual placas de 96 pozos (Costar, High Binding) fueron sensibilizadas con 50 µl/pozo con anticuerpo policlonal de cabra anti rotavirus RRV (CABRAX) diluido 1:5000 en PBS e incubadas a 4°C de 14-16 horas. Después se realizaron dos lavados a la placa con 150 µL/pozo con TNC- Tween 0.05% por dos veces y posteriormente se bloqueó con 150 µL/pozo con TNC-Tween con 5% de leche descremada Carnation por dos horas a 37°C.

Enseguida de dos lavados con TNC-Tween 0.05%, se agregaron 50 µl/pozo de lisado de células MA104 infectadas con rotavirus de la cepa RRV (rotavirus de simio) como fuente de antígeno y se incubaron por 2 horas a 37°C.

Se realizaron dos lavados con TNC-Tween 0.05% por 4 veces y se añadieron por duplicado los sobrenadantes de las heces disgregadas, posteriormente se incubaron por 1 hora a 37°C.

Después de realizar 4 lavados con TNC-Tween 0.05%, se agregaron 50 µL /pozo de anticuerpo de cabra anti-IgA de ratón conjugado a HRP (peroxidasa de rábano) diluido 1:1000 en TNC-Tween 0.05% con leche descremada Carnation al 5%, enseguida se incubaron a 37°C por 1 h.

Posteriormente las placas se lavaron con TNC-Tween 0.05% por 4 veces y se incubaron con 50 µL/pozo de o-fenilenediamina diluido en 5 ml de buffer de acetatos

y 10  $\mu$ l de peróxido de hidrogeno por 15 minutos a T.A, protegido de la luz. Para parar la reacción, se añadieron 50  $\mu$ l/pozo de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2M. Finalmente, la lectura de las placas se obtuvo a una longitud de onda de 492 nm en el espectrofotómetro MultiSkan 352 (LabSystems)

## **6.8 ELISA de IgG's séricas totales específicas contra rotavirus.**

Para determinar la producción de IgG resultantes de la infección se realizó una prueba ELISA de captura, en la cual placas de 96 pozos (Costar, High Binding) fueron sensibilizadas con 50 µl/pozo con anticuerpo policlonal de cabra anti rotavirus RRV (CABRAX) diluido 1:5000 en PBS e incubadas a 4°C de 14-16 horas. Después se realizaron dos lavados a la placa con 150 µl/pozo con TNC- Tween 0.05% por dos veces y posteriormente se bloqueó con 150 µl/pozo con TNC-Tween con 5% de leche descremada por dos horas a 37°C.

Enseguida de dos lavados con TNC-Tween 0.05%, se agregaron 50 µL/pozo de lisado de células MA104 infectadas con rotavirus de la cepa RRV (rotavirus de simio) como fuente de antígeno y se incubaron por 2 horas a 37°C.

Se realizaron dos lavados con TNC-Tween 0.05% por 4 veces y se añadieron por duplicado los sueros de los ratones infectados con rotavirus previamente diluidos 1:50 en PBS 1x, posteriormente se incubaron por 1 hora a 37°C.

Después de realizar 4 lavados con TNC-Tween 0.05% se añadió un anticuerpo policlonal de cabra anti IgG's totales de ratón marcado con fosfatasa alcalina 1:2000 diluido en TNC-Tween 0.05% con 5% de leche descremada, las placas se incubaron por una hora a 37°C. Finalmente se realizaron 4 lavados con TNC-Tween 0.05% y se añadió el sustrato p-nitrofenil fosfato disodio y las placas se incubaron por 1 hora a 37°C y a los 30, 45 y 60 minutos se tomaron las lecturas de absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro MultiSkan 352 (Labsystems).

## **6.9 Evaluación de la modificación de la microbiota intestinal sobre la efectividad de la vacuna oral monovalente.**

Los ratones fueron tratados con la mezcla de antibióticos que contenía Metronidazol (50 µg/kg), Ciprofloxacina (5 µg/kg) y Vancomicina (25 µg/kg) vía intraperitoneal durante 3 días con la finalidad de modificar la microbiota intestinal, y vacunados 2 días después de la última dosis de antibiótico con la vacuna oral monovalente Rotarix de GlaxoSmithKline con una dosis de  $7.3 \times 10^4$  DICC (dosis infectantes en cultivo celular). Previo a la vacunación se administraron 100 µL de solución de bicarbonato al 1.33% para neutralizar el pH gástrico.

Catorce días después de la vacunación los ratones fueron infectados con  $10^4$  ufc en 100 µL de medio DMEM libre de suero utilizando una cánula gastroesofágica para su administración. Previo a la infección, se administraron 100 µL de bicarbonato al 1.33% por vía oral con el fin de neutralizar el pH ácido del estómago y facilitar la infección. Las muestras de heces fueron tomadas desde el día de infección y en los 8 días subsecuentes.

Al día 14 post infección se tomaron muestras de 500 µL sangre periférica, la cual fue centrifugada a 6000 rpm durante 5 min. El suero obtenido fue utilizado para la determinación de anticuerpos séricos anti-rotavirus IgG.

## **6.10 Cuantificación de colonias bacterianas.**

Para analizar las bacterias presentes en las heces de ratones con y sin tratamiento antibiótico, se colectó 1g de muestras que fueron resuspendidas en medio LB e incubadas durante 2 horas a 37°C utilizando una agitación de 200 rpm en una incubadora shaker. Posteriormente se realizaron diluciones tomando 1 ml de las heces disgregadas y colocándolas en PBS 1 para realizar las diluciones seriadas  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$ .

Se tomó un 100  $\mu$ L de cada una de las diluciones y con ayuda de perlas de ebullición fue dispersado en una caja Petri que contenía medio LB más agar. Las cajas Petri sembradas fueron incubadas 24 horas a 37°C.

Finalmente se contabilizaron las colonias resultantes del procedimiento anterior con ayuda de una lámpara de electroforesis, así como con la aplicación Colony Counter de Promega.

## **6.11 Evaluación histológica del intestino.**

Se colectaron diferentes regiones del intestino delgado de ratones tratados bajo las diferentes estrategias con los antibióticos al día 3 post-tratamiento y de ratones sin tratamiento. Los ratones fueron sacrificados por dislocación y disectados para la obtención de los tejidos de interés, en este caso bazo y duodeno.

Los fragmentos de intestino fueron fijados inmediatamente después de su extracción en paraformaldehído al 4%. Posteriormente los tejidos fueron infiltrados en parafina para formar bloques, los cuales fueron cortados con ayuda de un micrótopo en secciones finas de 5  $\mu\text{m}$  y montados en una lámina portaobjetos de vidrio.

Una vez montadas se procedió a desparafinar los cortes para permitir que las soluciones penetraran en el tejido, esto mediante dos inmersiones separadas de 5 minutos en xileno, seguido de esto el tejido fue hidratado a través de una serie decreciente (100 %, 90% y 70%) de alcohol para eliminar el xileno, y finalmente se realizó un lavado con agua destilada.

Los tejidos hidratados fueron incubadas por 10 minutos en la solución de hematoxilina, trascurrido ese tiempo fueron lavados con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y sumergidas en alcohol ácido ( 1% de ácido clorhídrico en etanol) para acentuar el colorante, posterior a ello fueron lavados con agua destilada para eliminar residuos, hecho esto se procedió a introducir las

muestras en una solución de eosina durante 2 minutos y al terminar este periodo fueron lavadas para eliminar el exceso de colorante.

Las muestras teñidas se sumergieron en una serie de soluciones crecientes de agua y etanol (70%, 90%, 100%) para eliminar el agua. Seguido de esto los cortes fueron inmersos en xileno en dos periodos de 3 minutos cada uno.

Para finalizar los portaobjetos que contenían las muestras fueron cubiertas con un cubreobjetos y un sellador con la finalidad de proteger el tejido y ser observados en un microscopio ZEISS Primo Star, las fotografías fueron captadas con la cámara Axio Cam ERc 5s adaptada al mismo microscopio.

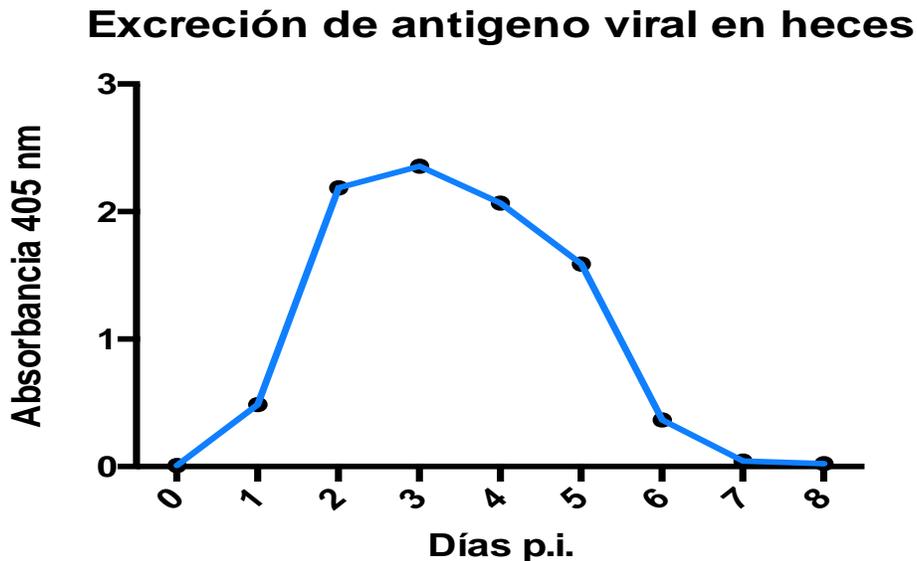
## **6.12 Análisis estadístico.**

Para el análisis de datos se utilizó estadística descriptiva con cálculo de medias y desviación estándar con el programa estadístico GraphPad Prism 7. Para el estudio de comparación de medias entre los grupos se realizó el estudio de comparaciones múltiples ANOVA. Para las diferencias de medias entre dos grupos se utilizó la prueba T no paramétrica, se consideró un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Efecto del tratamiento con antibióticos vía oral previo a la infección por rotavirus.

Los resultados comparativos entre los grupos de ratones (5 ratones BALB/c) se muestran en las siguientes gráficas. En la gráfica 1, se muestra el desarrollo normal de la infección por el rotavirus murino EDIM en curva de excreción de antígeno viral en heces en el modelo de ratón. Como se puede observar el día 1 p.i el virus inicia su replicación, teniendo el pico máximo de excreción de antígeno viral al día 2, la cual se mantiene a lo largo de 5 días comenzando a decaer, para el día 7 y 8 ya no hay virus detectable en las heces de los ratones.



*Grafica 1. Curva de excreción de antígeno viral en heces de ratones infectados con rotavirus.* Se presenta el promedio de la carga viral encontrada en las heces de los 5 ratones infectados con  $10^4$ Uff con el rotavirus EDIM.

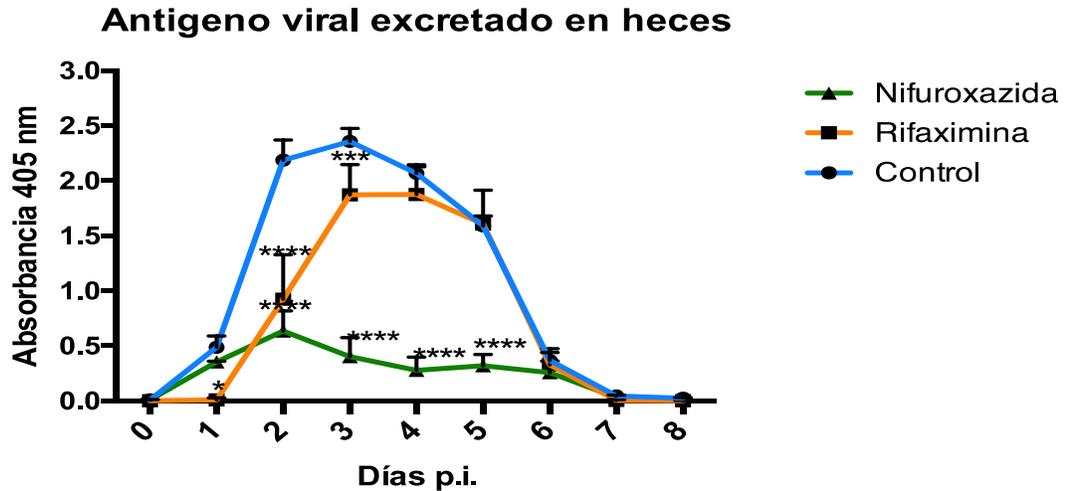
Para evaluar el efecto de la modificación de la microbiota intestinal previo a la infección se utilizaron 3 grupos experimentales, el grupo 1 fue el grupo control al cual solo se le infectó con  $10^4$  Uff de rotavirus EDIM sin que se le administrara ningún tratamiento antibiótico. El grupo 2 y 3 fueron tratados con Rifaximina y Nifuroxazida respectivamente, en dosis de 100 mg/kg durante 7 días antes de la infección.

En la gráfica 2, se evalúa el efecto de Rifaximina y Nifuroxazida administradas previo a la infección. En el caso de Rifaximina el inicio de la infección se ve retrasado siendo hasta el D2 post-infección (p.i) cuando comienza a ser detectado de manera importante, sigue un curso normal, aunque por debajo de los rangos detectados en el grupo control desde los días 1,2 y 3 p.i ( $p < 0.001$ ), a partir del día 5 la curva se comporta de manera idéntica a los controles no mostrando significancia estadística entre sus valores.

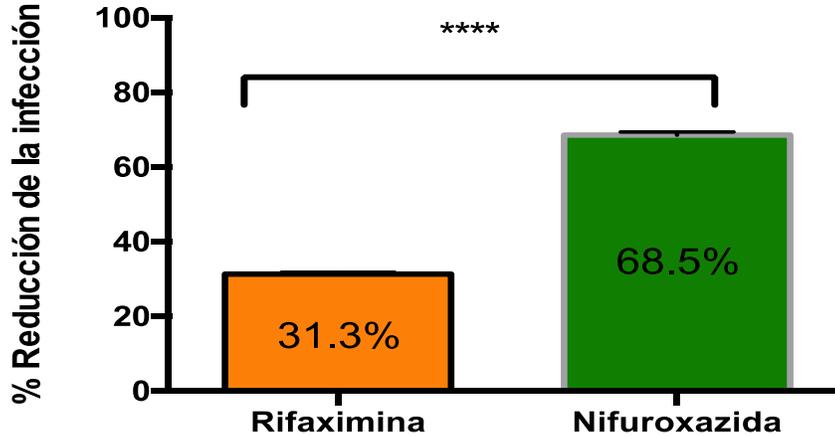
El segundo grupo fue tratado con Nifuroxazida mostró diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) al D2 p.i cuando la carga viral comienza a elevarse alcanzando su pico máximo para el D3 p.i, se evidencia una excreción de partículas virales significativamente menor respecto al grupo control ( $p < 0.00001$ ), el final de la infección en los días 7 y 8 p.i es similar en los 3 grupos, lo cual indica que el tratamiento antibiótico previo a la infección impacta la excreción de las partículas virales en heces pero no así en la duración de la infección.

En el apartado B de la gráfica 2 podemos observar reducción de la infección que tuvieron los tratamientos antibióticos con base a las áreas bajo la curva, mostrando ambas, diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.00001$ ) respecto al control.

a)



b)



**Gráfica 2. Excreción de antígeno viral en heces en ratones con tratamiento antibiótico previo a la infección. A) Curva de excreción de antígeno durante la infección por rotavirus.** Se presenta la gráfica representativa del promedio de la carga viral encontrada en las heces de los 5 ratones infectados  $10^4$ Uff con el rotavirus EDIM tratados 1 semana previo a la infección con Rifaximina (RFX) 100 mg/kg, Nifuroxazida (NFX) 100 mg/kg y el grupo control. **B) Porcentajes de reducción de la infección.** Reducción de la infección basado en el área bajo la curva respecto al grupo control. Prueba ANOVA; análisis de comparaciones múltiples para diferencia de medias ( $p < 0.05$ ).

## **7.2 Efecto del tratamiento con antibióticos vía oral durante la infección por rotavirus.**

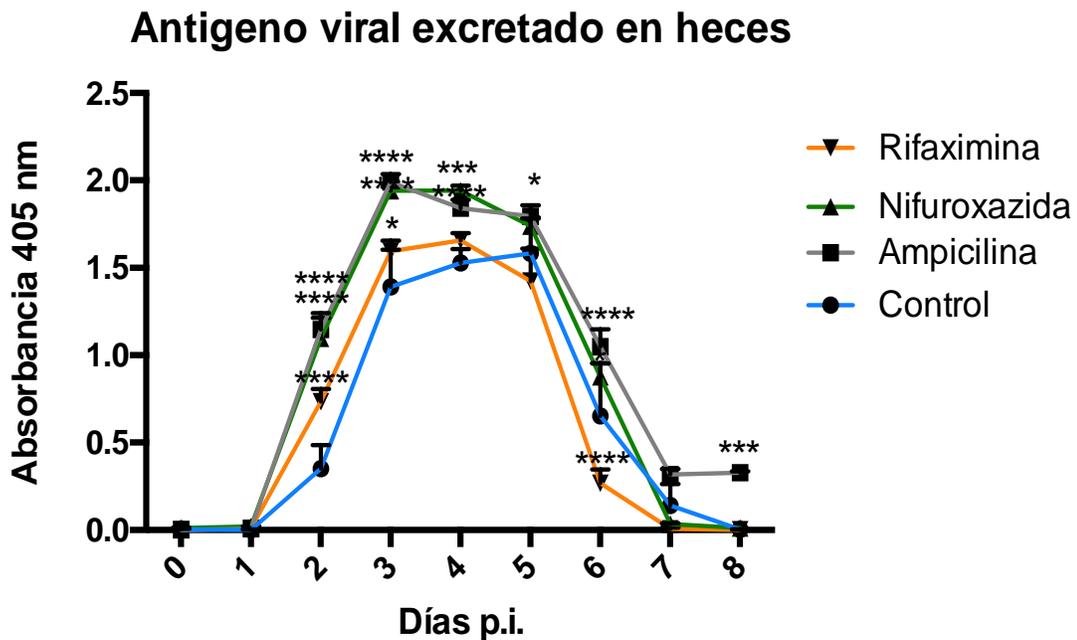
Con base en los resultados obtenidos del experimento anterior este experimento, se consideró la realización de un experimento mas con la finalidad de evaluar el efecto de la administración de estos antibióticos durante la infección sobre la excreción de antígeno viral en heces, agregando además un grupo tratado con ampicilina oral, cuyo efecto ya ha sido reportado por Uchiyama *et al.*, (12), quienes conservaron cambios importantes en la carga viral y producción de anticuerpos en ratones tratados con este antibiótico, lo cual se reporta a continuación.

Se tuvo un grupo control y cada uno de los 3 grupos restantes fueron tratados con un antibiótico distinto (Rifaximina, Nifuroxazida y Ampicilina). Los antibióticos fueron administrados vía oral con ayuda de una cánula gastroesofágica en dosis de 100 mg/kg, una vez al día durante 7 días a partir del día de la infección.

Como puede observarse en la gráfica 3, los grupos tratados con Rifaximina, Nifuroxazida así como el control mostraron una curva de infección sin diferencias

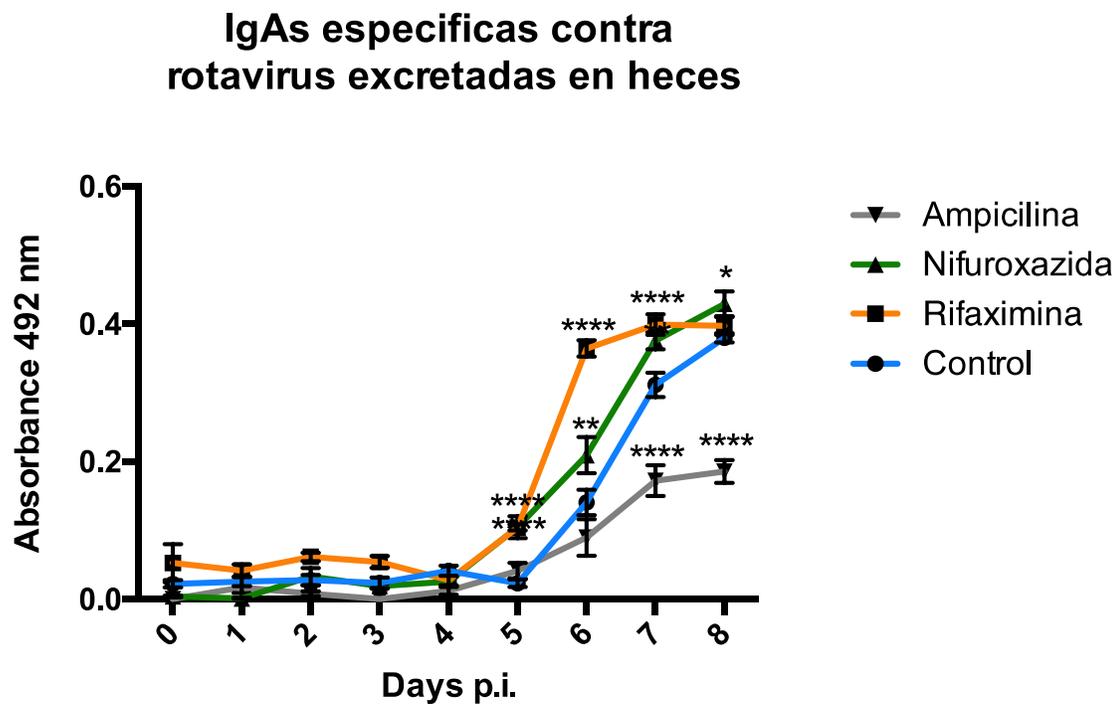
significativas, a excepción del día 6 donde Nifuroxazida y Ampicilina mostraron una excreción de partículas virales en heces significativamente mayor ( $p > 0.0001$ ), incluso este último antibiótico mostraba presencia de partículas virales al día 8 p.i.

Con la administración de Rifaximina, se observaba una excreción de partículas virales mayor a la del grupo control ( $p < 0.0001$ ) al día dos, la cual se mantuvo hasta el día 4 p.i., pero inicia su descenso al día 6, pero el término de la infección se comportó de manera similar a la del grupo control desde el día 7 p.i.



**Gráfica 3. Excreción de antígeno viral en heces en ratones con tratamiento antibiótico durante la infección.** Se presenta la gráfica representativa del promedio de la carga viral encontrada en las heces de los 5 ratones infectados  $10^4$ Uff con el rotavirus EDIM tratados durante la infección con Rifaximina (RFX) 100 mg/kg, Nifuroxazida (NFX) 100 mg/kg, Ampicilina (AMP) comparados con el grupo control Prueba ANOVA; análisis de comparaciones múltiples para diferencia de medias ( $p < 0.05$ ).

En la gráfica 4, se observan los anticuerpos IgA específicos contra rotavirus encontrados en las heces de los ratones tratados con diferentes antibióticos por vía oral, en el D6 p.i. los ratones del grupo de Ampicilina mostraron niveles mas bajos que el grupo control y los tratados tanto con Rifaximina como con Nifuroxazida, comportamiento que se mantiene en los días 7 y 8 p.i donde la excreción es significativamente menor ( $p < 0.00001$ ) al de los grupos ya mencionados.



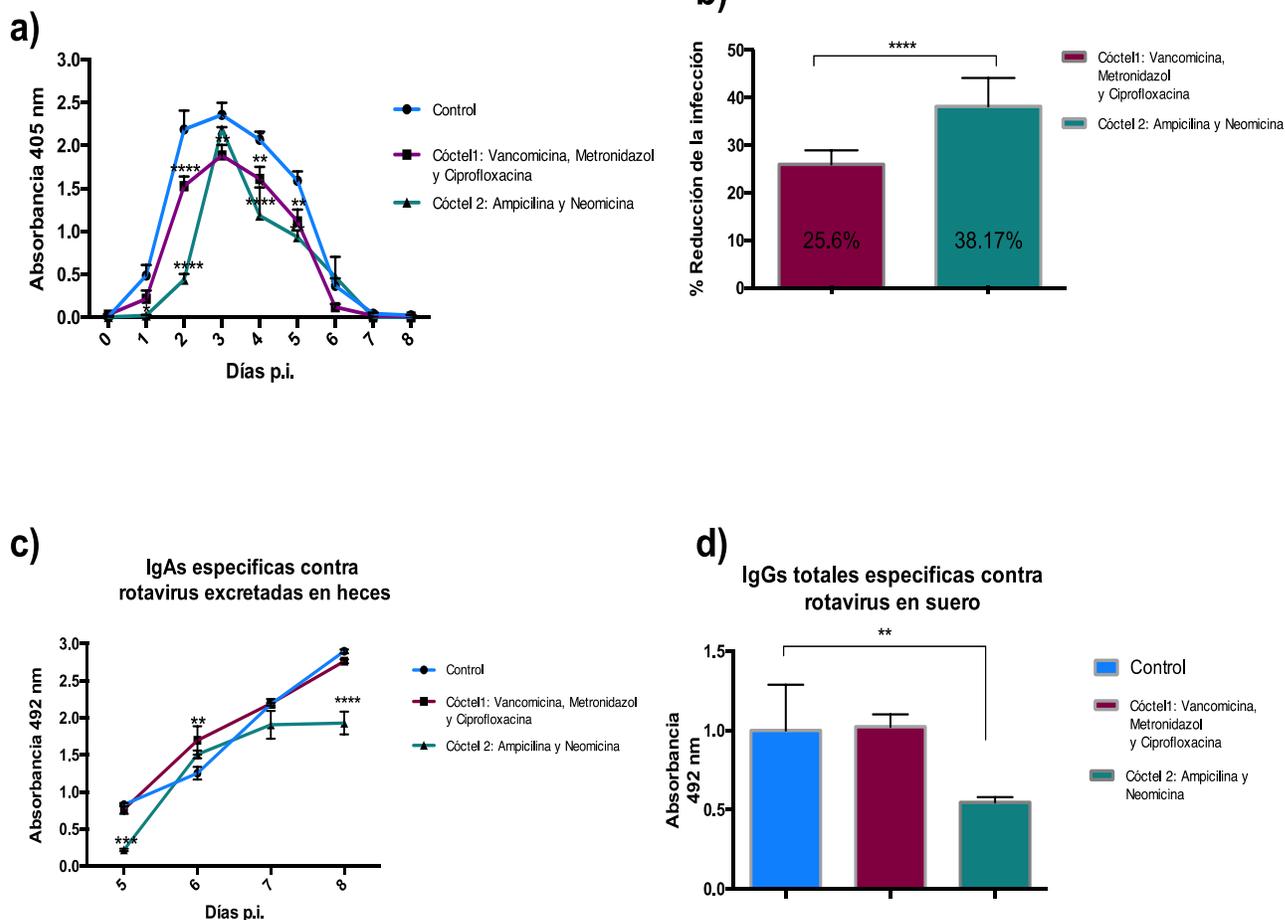
**Gráfica 4. Excreción de Anticuerpos IgA específicos contra rotavirus en heces** . Se presenta la gráfica representativa de dos experimentos de los anticuerpos IgA intestinales específicas contra rotavirus EDIM excretadas en las heces de ratones tratados durante la infección con Rifaximina (RFX) 100 mg/kg, Nifuroxazida (NFX) 100 mg/kg, Ampicilina (AMP) mg/kg comparados con el grupo control. Prueba ANOVA; análisis de comparaciones múltiples para diferencia de medias ( $p < 0.05$ ).

### **7.3 Efecto del tratamiento con antibióticos de amplio espectro vía intraperitoneal sobre la infección por rotavirus.**

En este experimento se evaluó el efecto de la administración de dos mezclas de antibióticos vía intraperitoneal en los grupos de ratones (5 ratones BALB/c), una constituida por Ciprofloxacina, Vancomicina y Metronidazol, y la otra, por Ampicilina y Neomicina, ambas administradas por 3 días previo a la infección, lo cual puede observarse en la gráfica 5.

En el Apartado A de la gráfica 5, se observa como al D1 p.i las curvas de infección de los grupos tratados con antibióticos inician de manera diferente al grupo control, siendo al D2 p.i cuando las curvas de infección muestran una excreción de heces menor a la del grupo control ( $p < 0.0001$ ), permaneciendo así hasta el D5 p.i. De los días 6 al 8 p.i. no se muestran diferencias significativas; en el apartado B se muestran los porcentajes de protección a la infección de los tratamientos antibióticos, siendo ambos significativamente diferentes respecto al grupo control ( $p < 0.00001$ ). En el apartado C se muestra la producción de anticuerpos IgA's específicos contra rotavirus. Los ratones tratados con el coctel 2 (Ampicilina y Neomicina) mostraron niveles de IgA menores al día 8 p.i ( $p < 0.0001$ ) respecto al grupo control. En el apartado C puede observarse la producción de anticuerpos séricos IgG's totales específicas contra rotavirus a los 14 días p.i., mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.00001$ ) entre el grupo tratado con Ampicilina y Neomicina comparado con el grupo control.

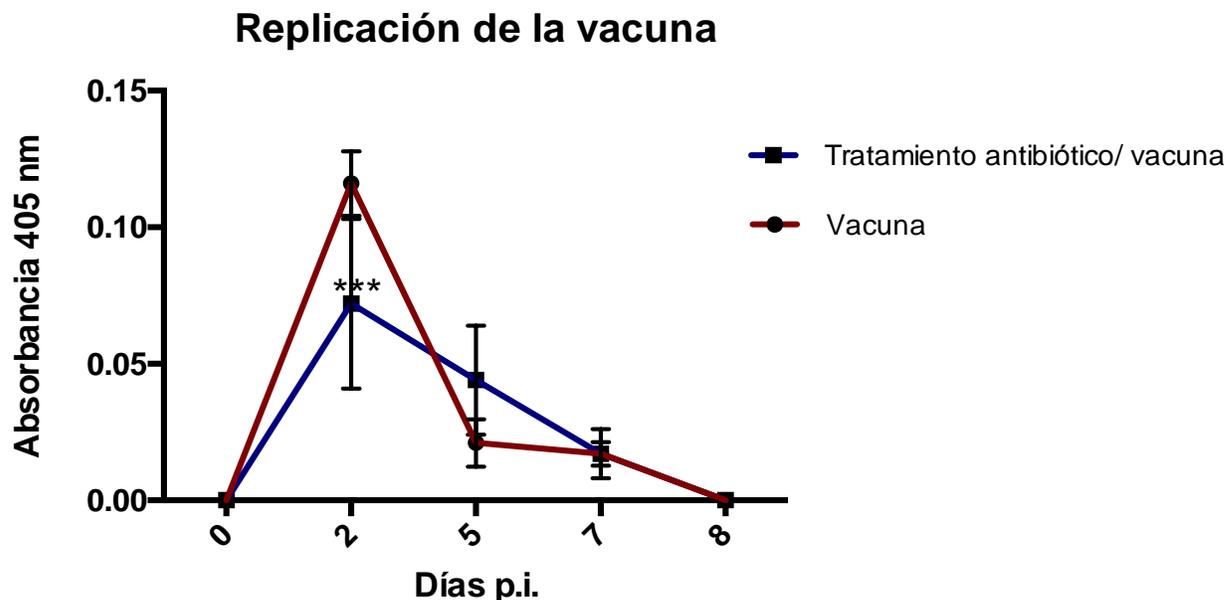
### Antígeno viral excretado en heces



**Gráfica 5. Excreción de antígeno viral y anticuerpos IgA en heces, así como de IgG totales en suero de ratones con tratamiento antibiótico intraperitoneal previo a la infección.** a) **Curva de excreción de antígeno viral en heces de ratones infectados.** Se presenta La gráfica representativa de 3 experimentos donde se muestra la carga de antígeno viral encontrada en las heces de los ratones infectados con  $10^4$ Uff con el rotavirus EDIM tratados con antibióticos, así como el grupo control. Un grupo fue tratado con Ampicilina y Neomicina (AN) 100mg/kg por 3 días previo a la infección vía intraperitoneal. Al otro grupo experimental se le administró Vancomicina 50 mg/kg, Ciprofloxacina 25 mg/kg y Metronidazol 5 mg/kg (VMC) por 3 días previo a la infección vía intraperitoneal. b) **Porcentajes de reducción de la infección.** Reducción de la infección en ratones con tratamiento antibiótico respecto al control. c) **Excreción de IgA's intestinales específicas contra rotavirus.** IgA's presentes en las heces de los 3 grupos experimentales del día 5 al 8 p.i. en ratones infectados con rotavirus EDIM tratados con el coctel de antibióticos 1 y 2 comparadas con el grupo control (sin tratamiento). d) **Anticuerpos IgG séricos.** Anticuerpos IgG presentes en suero al día 14 p.i. en ratones infectados con rotavirus EDIM tratados con el coctel de antibióticos 1 y 2 comparadas con el grupo control (sin tratamiento). Prueba ANOVA; análisis de comparaciones múltiples para diferencia de medias ( $p < 0.05$ ).

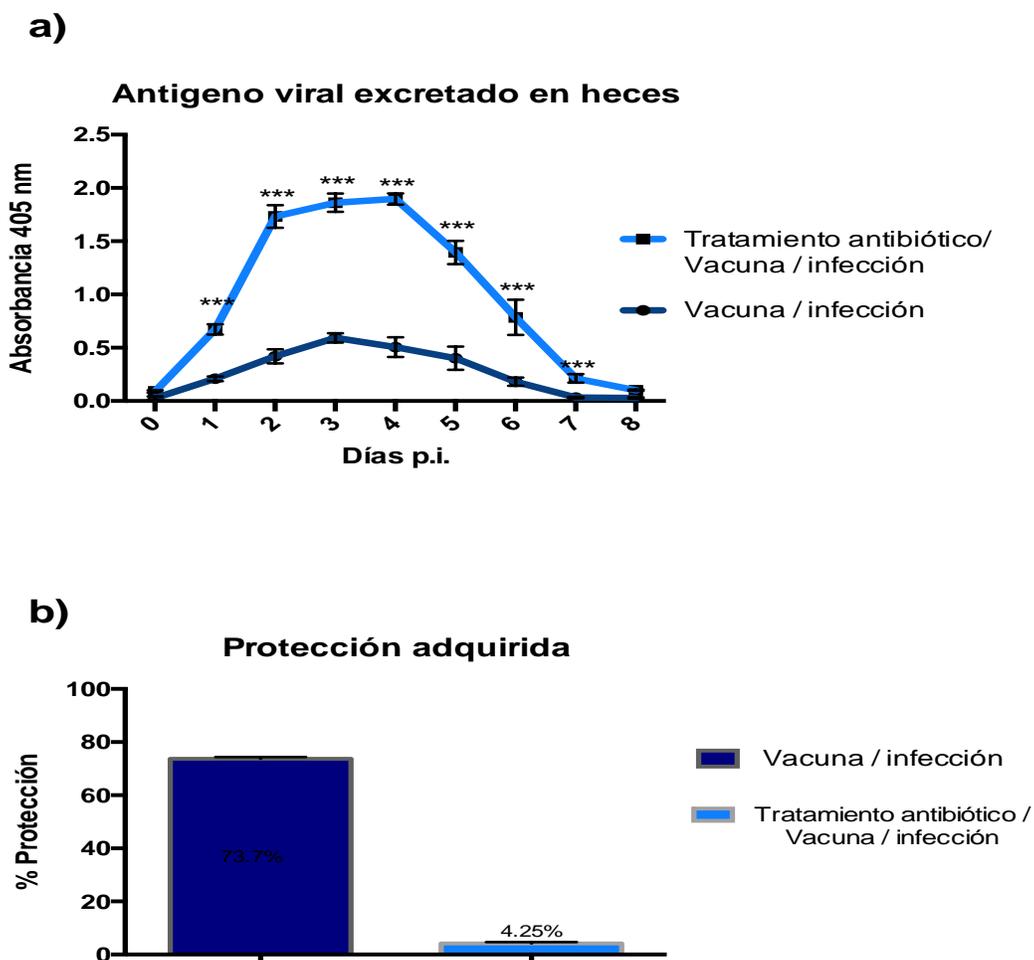
## 7.4 Efecto del tratamiento antibiótico sobre la protección adquirida con la vacuna oral atenuada contra rotavirus.

El efecto del tratamiento antibiótico sobre la replicación de la vacuna oral monovalente se observa en la gráfica 6, donde se muestran las curvas de replicación de las vacunas correspondientes a los ratones tratados con antibióticos con el coctel que contenía Vancomicina 50 mg/kg, Ciprofloxacina 25 mg/kg y Metronidazol 5 mg/kg vía IP durante 3 días. Dos días después del término del tratamiento antibiótico se administró la vacuna oral monovalente en una dosis de  $7 \times 10^4$  DICC (Dosis infectantes de cultivo celular).



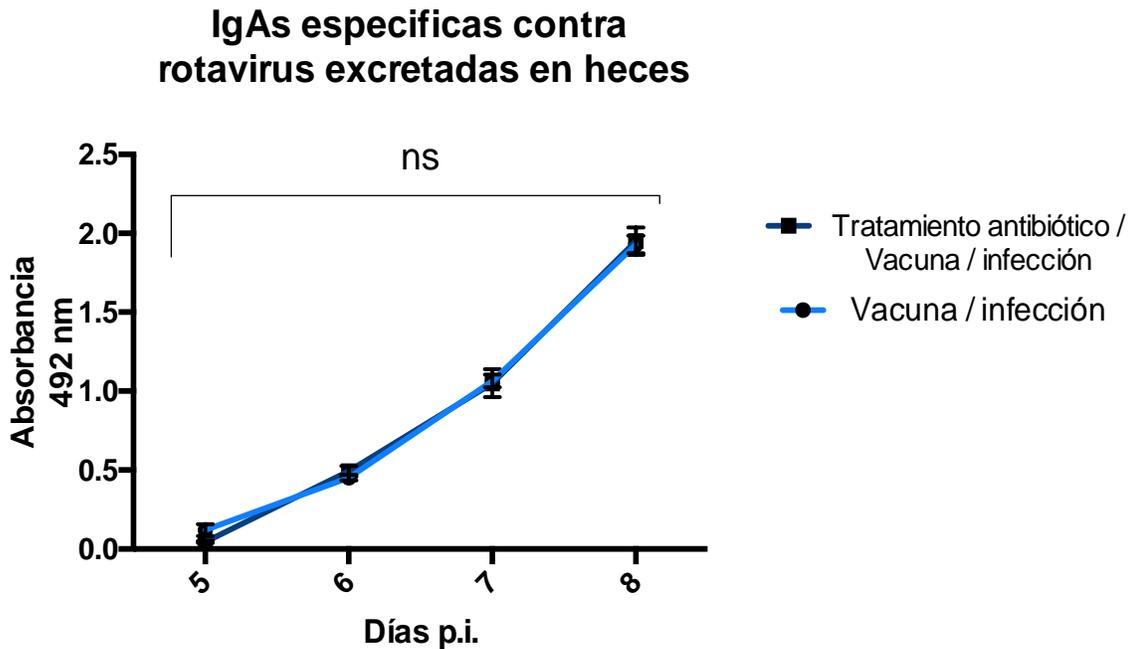
*Gráfica 6. Curva de excreción de antígeno viral en heces de ratones vacunados.* Se presenta la comparación del promedio de la carga viral encontrada en las heces de los 5 ratones tratados con Vancomicina 50 mg/kg, Ciprofloxacina 25 mg/kg y Metronidazol 5 mg/kg vía IP durante 3 días, vacunados con  $7.3 \times 10^4$  DICC de la vacuna oral monovalente contra Rotavirus. Prueba T para diferencias entre medias  $P < 0.05$ .

Los ratones vacunados fueron retados con rotavirus homologo EDIM  $10^4$  uff vía oral, y las heces fueron colectadas durante 8 días, tiempo en el que transcurre la infección, tal como se muestra en la gráfica 7.



**Gráfica 7. Antígeno viral excretado en heces y protección adquirida por la vacunación. a) Curva de excreción de antígeno viral en heces de ratones infectados.** Se presenta la gráfica representativa del promedio de la carga viral encontrada en las heces de los 5 ratones tratados con Vancomicina 50 mg/kg, Ciprofloxacina 25 mg/kg y Metronidazol 5 mg/kg vía IP durante 3 días, vacunados con  $7.3 \times 10^4$  DICC de la vacuna oral monovalente e infectados 14 días después con  $10^4$ Uff con el rotavirus EDIM comparadas con el grupo control, este último sólo vacunado e infectado. **b) Protección contra la infección.** Protección adquirida post vacunación en ratones con y sin tratamiento antibiótico previo la vacunación. Prueba T para diferencias entre medias; análisis de comparaciones múltiples.  $P < 0.05$ ,

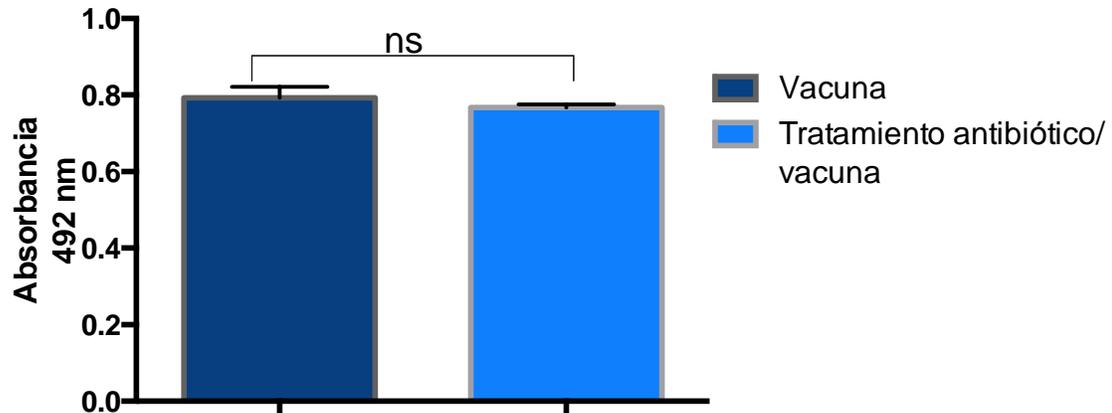
En la gráfica 9 se muestra la producción de anticuerpos de tipo IgA en el grupo control y en el grupo experimental.



**Gráfica 8. Excreción de IgA intestinales específicas contra rotavirus EDIM.** IgA's presentes en las heces de ratones vacunados con  $7.3 \times 10^4$  DICC de la vacuna oral monovalente comparada con el grupo control. Prueba T para comparación de medias; análisis de comparaciones múltiples  $p < 0.05$ , no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

En la Gráfica 10 se presenta la producción de anticuerpos igG totales presentes en los sueros de ratones del grupo experimental, así como de los controles 14 días después de la infección con el rotavirus murino EDIM.

### IgGs totales específicas contra rotavirus en suero



Gráfica 9. Producción de IgG totales específicas contra rotavirus EDIM. IgG's presentes en los sueros de los ratones vacunados con  $7.3 \times 10^4$  DICC de la vacuna oral monovalente comparada con el grupo control. Prueba T no paramétrica para comparación de medias,  $p < 0.05$ , no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

## 7.5 Comprobación del efecto del tratamiento antibiótico sobre la microbiota intestinal.

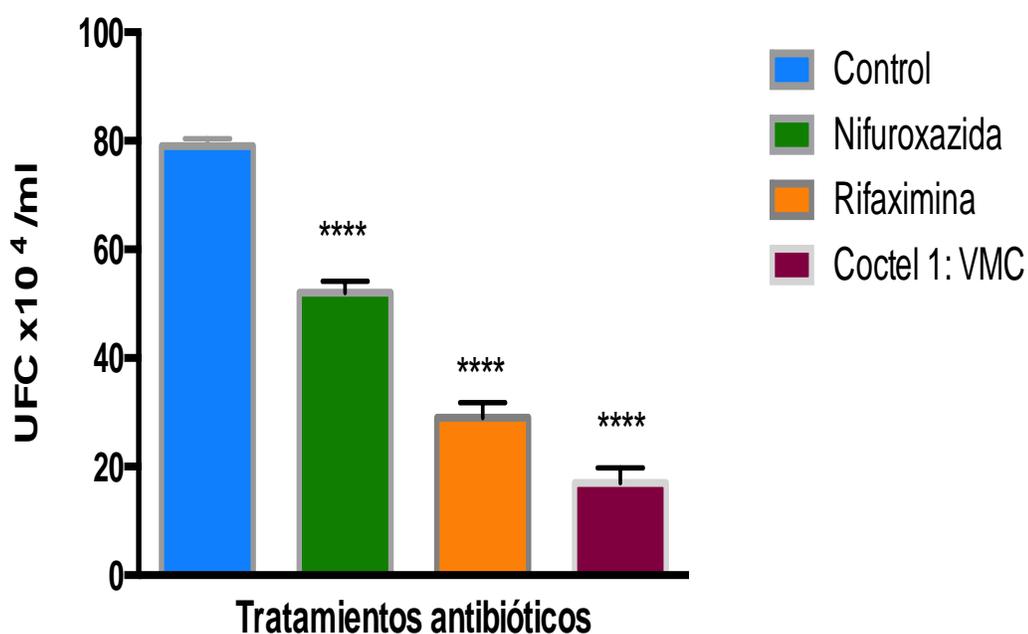
En la tabla 4 se presentan las colonias bacterianas presentes en las heces de ratones tratados con antibiótico y los ratones controles.

Tabla 4.

Conteo de UFC posterior al tratamiento antibiótico	
Tratamiento	UFC
Control	79 x10 <sup>4</sup>
Rifaximina	29 x10 <sup>4</sup>
Nifuroxazida	49 x10 <sup>4</sup>
Coctel 1: Vancomicina, Ciprofloxacina y Metronidazol.	17 x10 <sup>4</sup>

**Tab. 4. Conteo de UFC presentes en heces posterior al tratamiento antibiótico.** Colonias bacterianas presentes en las heces de ratones tratados con durante 3 días vía intraperitoneal con Vancomicina 50 mg/kg, Ciprofloxacina 25 mg/kg y Metronidazol 5 mg/kg (VMC); ratones tratados vía oral con Rifaximina (100mg/kg) y con Nifuroxazida (100mg/kg) comparadas con el grupo control, las heces fueron colectadas posterior al tratamiento bajo condiciones de asépticas y resuspendidas en PBS, quedando 3.3 %p/V, y se sembraron placas LB sin antibiótico, se incubaron durante 12hrs a 37°C. Las colonias fueron contadas usando la aplicación Colony Counter, Promega.

En la gráfica 6 se presenta la comparación de las UFC encontradas en las heces de los ratones con y sin tratamiento antibiótico encontrando una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

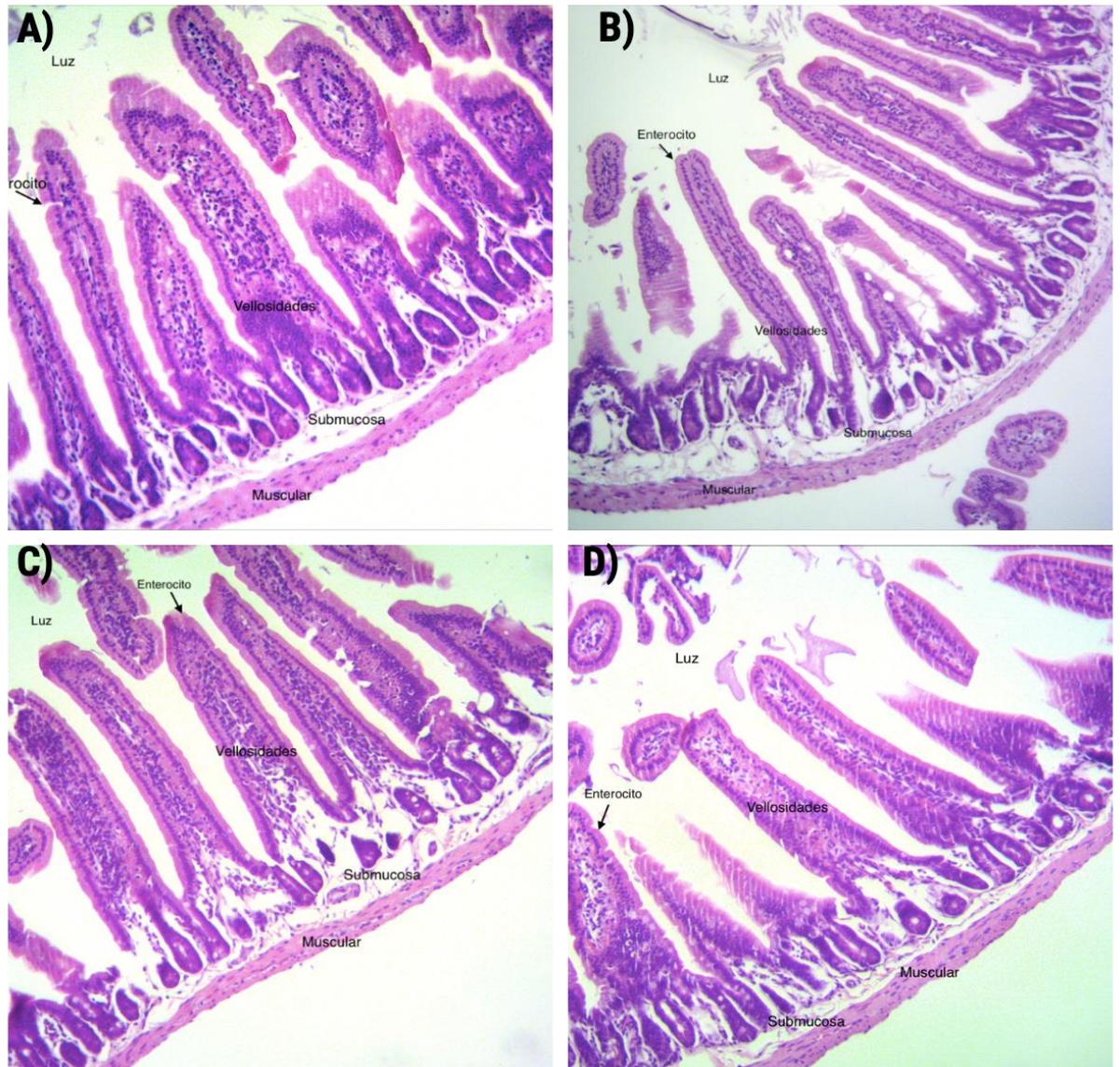


*Gráfica 11. UFC en heces.* UFC encontradas en las heces de los ratones tratados con Vancomicina 50 mg/kg, Ciprofloxacina 25 mg/kg y Metronidazol 5 mg/kg (VMC) comparadas con el grupo control. Las heces fueron colectadas posterior al tratamiento con VCM y tomadas bajo condiciones de asépticas y resuspendidas en PBS, quedando 3.3 %p/V, y se sembraron placas LB sin antibiótico durante 12hrs. Las colonias fueron contadas usando la aplicación Colony Counter, Promega. Prueba T no paramétrica para comparación de medias; análisis de comparaciones múltiples  $p < 0.05$ .

## **7.6 Análisis histológico del intestino delgado de ratones tratados con antibióticos.**

Con la finalidad de descartar que la administración de antibióticos vía oral o intraperitoneal ocasionaran inflamación o cambios estructurales a nivel de las microvellosidades intestinales de los ratones tratados, se realizaron cortes histológicos de duodeno de los ratones sometidos a tratamiento con antibióticos de amplio espectro vía oral (Rifaximina y Nifuroxazida) durante 7 días y vía intraperitoneal (Cóctel 1: Vancomicina, Ciprofloxacina y Metronidazol) durante 3 días, tal como se realizaba para los experimentos.

En la figura 5, se observan los cortes histológicos correspondientes a duodeno. Mostrando una capa muscular íntegra y sin inflamación manifiesta, de igual forma los enterocitos en las microvellosidades se muestran sin diferencias en su conformación y estructura. Con lo cual se comprobó que los antibióticos no modifican la estructura de las microvellosidades intestinales después de su administración, descartando que este factor pudiera interferir con la entrada del virus a la célula.



**Figura 6. Cortes histológicos del intestino delgado de ratones tratados con diferentes antibióticos y el grupo control. A) Grupo control.** Ratones sanos sin tratamiento. **B) Nifuroxazida.** Ratones tratados con 100mg/kg de Nifuroxazida vía oral durante 7 días **C) Rifaximina.** Ratones tratados con 100mg/kg de Rifaximina vía oral durante 7 días **D) Coctel 1.** Ratones tratados vía intraperitoneal con Vancomicina 50 mg/kg, Ciprofloxacina 25 mg/kg y Metronidazol 5 mg/kg. Cortes transversales de intestino delgado de 5  $\mu$ m de grosor y teñidos con hematoxilina y eosina, aumento 40X.

## 8. DISCUSIÓN

El estudio de la microbiota intestinal actualmente ha cobrado gran relevancia ya que se asocia al desarrollo y mantenimiento de enfermedades metabólicas, infecciosas, crónicas y agudas, así como a estados de bienestar. La microbiota intestinal consta de millones de microorganismos en estrecha relación que mantienen un delicado equilibrio, el cual es necesario para llevar a cabo diversas funciones tanto en el metabolismo del hospedero como en el sistema inmune. A este equilibrio se le ha denominado como eubiosis el cual mantiene un estado de salud benéfico en el organismo, y cuando este equilibrio se ve alterado, conduce a estados de inflamación bajo grado que pudiesen detonar algunos otros padecimientos. Sin embargo, poco se sabe de la relación de la microbiota intestinal en infecciones virales y en la respuesta hacia las vacunas orales atenuadas contra rotavirus. En la actualidad contamos con dos tipos de vacunas orales atenuadas, la vacuna contra la polio y la vacuna contra rotavirus, ambas con un alto grado de inducción de protección en la población infantil, pero cuyos mecanismos efectores no se conocen del todo.

Al respecto se ha sugerido que la microbiota juega un papel muy importante en la generación de respuestas inmunes protectoras y eficientes contra ambos virus, y que cuando la microbiota se encuentra alterada esta protección no es tan eficiente.

En el presente trabajo decidimos evaluar cuál es la asociación del estado de la microbiota intestinal durante la infección por rotavirus, un virus que infecta los enterocitos maduros del intestino delgado y que puede ser detectado en heces de ratones infectados. El modelo murino de infección por rotavirus presenta muchas ventajas, pues además de ser un modelo homólogo, es decir un virus murino, puede ser evaluada a fondo la respuesta inmune generada durante un protocolo de vacunación y durante la infección.

Por esta razón se decidió evaluar si la modificación de la microbiota intestinal mediante el uso de antibióticos altera la duración y la cantidad de virus excretado durante la infección por rotavirus y si esta modificación altera la respuesta inmune hacia una vacuna comercial formulada con virus atenuados de diferentes cepas de este virus, la cual en humano genera una protección por encima del 90% hacia gastroenteritis severas en México, con poca eficiencia en otros países de África, asumiendo la participación de la microbiota como un elemento clave (76). Esta vacuna ha sido evaluada en el modelo murino donde se obtiene una protección de entre el 60 al 90% ante el reto con un rotavirus murino según los datos publicados (77) siendo una respuesta heteróloga, ya que la vacuna contra rotavirus contiene un serotipo diferente al del rotavirus murino, por lo que la protección no es del 100%.

Si bien el uso de antibióticos no es algo indicado para el tratamiento de infecciones virales, se ha observado que su administración en caso de gastroenteritis de origen desconocido, el cual se presume viral, ayuda a la eliminación y disminución de la

diarrea. En el caso de diarrea del viajero causada por norovirus, La administración de antibióticos lumbales como la rifaximina tienen efecto en la duración y severidad del cuadro diarreico. En el caso de la infección por norovirus, se ha demostrado que hay una asociación entre elementos de las bacterias de la microbiota que favorecen y promueven la infección, por lo que la eliminación de las bacterias mediante el uso de antibióticos favorece la eliminación del virus de manera indirecta. Por tal motivo, en este proyecto decidimos utilizar diferentes antibióticos con la finalidad de modificar la microbiota y evaluar la infección en el modelo murino, además de evaluar esta modificación sobre la protección inducida hacia la vacuna oral atenuada contra rotavirus utilizada en México en el esquema de vacunación del sector salud.

Para el caso de rotavirus, existen muy pocos reportes que sugieren que la microbiota es importante para que se lleve a cabo una infección de manera exitosa. Uno de los ensayos más relevantes en este punto es que utilizando neomicina y ampicilina se observa el mismo efecto de disminución de la carga viral que en los ratones libres de gérmenes apoyando la idea de que la microbiota es necesaria para la infección. Sin embargo, en estos experimentos, tanto la ampicilina como la neomicina fueron puestos *ad libitum* en el agua en dosis muy altas por 7 días, lo cual no es lo más indicado, pues los ratones consumen menos agua de lo normal debido al mal sabor que esta presenta, provocando un estado de deshidratación que podría estar alterando el ambiente intestinal y *por ende* la replicación viral,

haciendo casi imposible determinar la dosis de antibiótico que consumió cada ratón de manera individual.

Por estas razones, en nuestro protocolo se incluyeron antibióticos de amplio espectro tanto vía oral, administrados en una sola dosis diaria con la ayuda de una cánula gastroesofágica, y administrados por vía intraperitoneal, en una sola dosis diaria previos a la infección administrándolos solo 3 días previo a la infección. Los antibióticos evaluados en el modelo de infección por rotavirus fueron rifaximina y nifuroxazida, usando dosis diarias de 100mg/kg 7 días previos a la infección, con lo que asegurábamos la modificación de la microbiota antes de la infección y también otro ensayo donde se administraron seguidos a la infección. Bajo este esquema de antibióticos encontramos que efectivamente ambos antibióticos tienen un efecto sobre la replicación viral y sobre la duración de la infección siendo más significativo el cambio cuando los antibióticos son administrados previo al reto.

Los resultados obtenidos muestran que la excreción de antígeno viral en heces si disminuye significativamente cuando los antibióticos son administrados previos a la al reto, mientras que la producción de anticuerpos intestinales de los ratones tratados no muestran diferencias respecto al grupo control en contraste con lo reportado por Uchiyama *et al.*, (12) quienes encontraron diferencias significativas utilizando ampicilina y neomicina en el aumento de IgA's con respecto al grupo control. En nuestro caso la producción de IgA's es menor a lo reportado, y cuando la ampicilina es administrada durante la infección, la curva de excreción es mayor

al control, fenómeno que no había sido observado con otros antibióticos. Con estas observaciones, corroboramos que los antibióticos administrados vía oral, solo presentan un efecto en la disminución de la carga viral cuando son administrados previos al reto con el rotavirus EDIM, hecho que sugiere, que rotavirus requiere de elementos de la microbiota intestinal para infectar de inicio, pero una vez establecida la infección, la microbiota no parece ser determinante. Cabe mencionar que los antibióticos administrados por esta vía, a excepción de la ampicilina, tienen muy poca absorción y son considerados como antisépticos luminales, los cuales solo ejercen su acción antibiótica y en algunos casos bacteriostática durante su paso por el lumen intestinal, por lo que el tiempo de vida en el organismo es relativamente corto.

En los ratones tratados con el coctel de antibióticos vía intraperitoneal vancomicina, ciprofloxacina y metronidazol antes del reto, se observó una disminución de la excreción de antígeno viral en heces con alto grado de significancia con respecto al grupo control pues desde el inicio y al día 6 acortando la curva de excreción viral con respecto al grupo control. En contraste los ratones tratados con el coctel con ampicilina y neomicina vía intraperitoneal la duración de la infección fue la misma, solo con una disminución menor en la cantidad de antígeno viral excretado.

Para corroborar que la microbiota estaba alterada por los tratamientos con antibióticos, se analizó el número de colonias de bacterias presentes en las heces de los ratones dos días después del tratamiento, justo cuando se hace el reto con

el rotavirus. Para ello, las heces fueron colectadas y disgregadas en PBS y sembradas en medio LB sin antibiótico, teniendo así un parámetro indirecto de crecimiento, pues solamente representa a bacterias que crecen en condiciones aerobias en este medio. Esta determinación se hizo para todas las condiciones de tratamiento usadas en este proyecto. Para los ratones tratados con el coctel de vancomicina, ciprofloxacina y metronidazol vía intraperitoneal, se determinó disminución de 4.6 veces en las colonias bacterianas obtenidas de las heces de los ratones con respecto al control, así mismo con los antibióticos orales encontramos una disminución de 1.5 para niforoxacida y 2.7 veces para rifaximina, lo cual nos indica que efectivamente hay un efecto al menos en el número de colonias de bacterias intestinales.

Además de lo anterior, un aspecto que se evaluó fue que los antibióticos no estuviesen alterando la arquitectura ni el estado basal del intestino, y por tanto no fuese un ambiente óptimo para la replicación viral, causando una disminución como consecuencia al daño celular y no a la disminución de las bacterias intestinales, por esta razón se realizó el estudio histológico del intestino, de la región de duodeno-iléon, sitio donde se instala la infección por rotavirus, después de la exposición a los antibióticos, los cuales se sabe que pueden también modular la respuesta inmune *per se*. Los resultados del análisis de cortes histológicos tenidos con hematoxilina y eosina no mostraron cambios en la estructura del intestino delgado ni inflamación con lo cual descartamos que la disminución de la excreción de partículas virales en heces se deba a algún daño causado por los antibióticos al epitelio intestinal.

Teniendo los datos anteriores, se decidió evaluar cuál sería el efecto de la administración de los antibióticos sobre la protección inducida por la vacuna oral atenuada contra rotavirus, ya que existen evidencia de que los antibióticos potencian la respuesta humoral aumentando la producción anticuerpos actuando como adyuvantes, sin embargo, estos anticuerpos en nuestro modelo no parecen estar participando en la protección. Para esto se realizó el mismo protocolo de modificación con el coctel de antibióticos Intraperitoneales Vancomicina, Metronidazol y Ciprofloxacina, posteriormente se administró la vacuna oral atenuada en los ratones sanos, pasados 14 días se procedió a infectar con rotavirus EDIM y evaluar la protección generada por la vacuna.

Cuando se administran previo a la vacunación, observamos una disminución altamente significativa en la protección inducida por la vacuna. Al parecer al igual que el rotavirus murino, la vacuna al ser de virus atenuado, requiere de replicarse en presencia de elementos de la microbiota, que al ser eliminados disminuyen su eficacia. La replicación del virus vacunal es necesaria para activar e inducir la respuesta inmune del ratón. Esto ya había sido reportado por Harris *et al.* (18), quienes también modificaron la microbiota intestinal en humanos voluntarios a administrando diferentes antibióticos observando que la vacuna no se replicaba cuando estos se administraban previo a la vacunación, por lo que se sugiere que en estos casos la respuesta protectora sería ineficiente, sin embargo, esto solo puede sugerirse pues solo se midió el antígeno vacunal en heces y la respuesta de anticuerpos.

Un dato importante en este estudio, es que la modificación de la microbiota no altera de manera significativa la producción de anticuerpos IgA's durante la infección salvo en el caso de la administración ampicilina y neomicina oral e intraperitoneal, en contraste con lo reportado por Uchiyama quien observo una potenciación en la producción de estos anticuerpos. En los demás tratamientos no se observan cambios significativos en la producción de anticuerpos IgA's ni IgG's específicos contra rotavirus, por lo que los antibióticos no parecen estar modulando el tipo de respuesta durante la infección. En el caso de los vacunados tampoco observamos anticuerpos previos a la vacunación, observación que será evaluada posteriormente.

Por lo anterior podemos concluir, que la modificación de la microbiota intestinal impacta el desarrollo de la infección por rotavirus en un modelo murino, aportando evidencia que confirma que rotavirus al igual que poliovirus, norovirus o reovirus, utiliza elementos de la microbiota para asegurar su infección. Y que además esto podría estar influyendo en la respuesta inmune a la vacuna oral contra rotavirus si al momento de su administración existiera alguna disrupción en el ecosistema intestinal.

Esta investigación da pie al estudio específico de los elementos de la microbiota intestinal que participan en el establecimiento de la infección, y de los mecanismos de los que Rotavirus hace uso para su beneficio. Lo cual sería de gran relevancia para mejorar las estrategias de salud que permitan un mejor abordaje de la

enfermedad así como de posibles mejoras en las estrategias de vacunación en poblaciones de alto riesgo, en donde la composición de la microbiota pudiese tener un efecto en la protección generada por las vacunas orales contra rotavirus.

## 9. CONCLUSIONES

- La administración oral de Nifuroxazida y Rifaximina durante 7 días previo a la infección disminuye la excreción de antígeno viral en heces.
- La administración oral de Nifuroxazida y Rifaximina durante la infección modifica el inicio de la infección así como la cantidad de antígeno viral excretado en heces.
- La administración de Ampicilina vía oral durante a infección disminuye la producción de IgA intestinales.
- La administración de antibióticos de amplio espectro como Vancomicina, Ciprofloxacina y Metronidazol vía IP durante 3 días previo al reto disminuyen excreción de antígeno viral en heces de rotavirus en ratones infectados.
- La administración de Vancomicina, Ciprofloxacina y Metronidazol durante 3 días vía intraperitoneal previo a la infección no modifican la producción de IgG específicas contra rotavirus presentes en suero con respecto al grupo control.
- La administración Vancomicina, Ciprofloxacina y Metronidazol vía IP durante 3 días previa a la vacunación impacta de manera negativa en la protección contra la infección por rotavirus, no así en la producción de anticuerpos IgA intestinales e IgG totales séricos.

## 10. PERSPECTIVAS

- Analizar mediante secuenciación o PCR las muestras de heces después del tratamiento antibiótico para determinar los cambios específicos en las poblaciones bacterianas presentes en la microbiota intestinal.
- Evaluar los elementos de la microbiota en células infectadas en cultivo celular para evaluar la infectividad en presencia de estos.
- Evaluar la respuesta a otra vacuna oral tetravalente atenuada contra rotavirus bajo las mismas condiciones experimentales.
- Determinar la especificidad, avidéz, eficacia y capacidad neutralizante de los anticuerpos específicos contra rotavirus, presentes en las heces y sueros de ratones tratados con antibióticos.

## REFERENCIAS

1. Cho I, Blaser MJ. APPLICATIONS OF NEXT-GENERATION SEQUENCING The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet.* 2012;13(4):260–70.
2. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut [Internet].* 2016 Feb [cited 2019 Apr 22];65(2):330–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26338727>
3. Consortium THMP, Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature [Internet].* 2012 Jun 14 [cited 2019 Apr 22];486(7402):207–14. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature11234>
4. Floch MH. Intestinal Microecology in Health and Wellness. *J Clin Gastroenterol [Internet].* 2011 [cited 2019 Apr 22];45:S108–10. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00004836-201111001-00004>
5. Hattori M, Taylor TD. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res [Internet].* 2009 Feb [cited 2019 Apr 22];16(1):1–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19147530>
6. Kim H, Sitarik AR, Woodcroft K, Johnson CC, Zoratti E. Birth Mode, Breastfeeding, Pet Exposure, and Antibiotic Use: Associations With the Gut Microbiome and Sensitization in Children. *Curr Allergy Asthma Rep [Internet].* 2019 Apr 11 [cited 2019 Apr 22];19(4):22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30859338>
7. Perez-Muñoz ME, Arrieta M-C, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome [Internet].* 2017 [cited 2019 Apr 22];5(1):48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28454555>
8. Francino MP. Birth Mode-Related Differences in Gut Microbiota Colonization and Immune System Development. *Ann Nutr Metab [Internet].* 2018 [cited 2019 Apr 22];73(3):12–6.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30041189>

9. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 19];81(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29118049>
10. Fiebigler U, Bereswill S, Heimesaat MM. Dissecting the Interplay Between Intestinal Microbiota and Host Immunity in Health and Disease: Lessons Learned from Germfree and Gnotobiotic Animal Models. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2019 Apr 22];6(4):253–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27980855>
11. Karl JP, Hatch AM, Arcidiacono SM, Pearce SC, Pantoja-Feliciano IG, Doherty LA, et al. Effects of Psychological, Environmental and Physical Stressors on the Gut Microbiota. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 18];9:2013. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30258412>
12. Uchiyama R, Chassaing B, Zhang B, Gewirtz AT. Antibiotic treatment suppresses rotavirus infection and enhances specific humoral immunity. *J Infect Dis*. 2014;
13. Nagao-Kitamoto H, Kitamoto S, Kuffa P, Kamada N. Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases. *Intest Res* [Internet]. 2016 Apr [cited 2019 Jun 12];14(2):127–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27175113>
14. So D, Whelan K, Rossi M, Morrison M, Holtmann G, Kelly JT, et al. Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2019 Apr 22];107(6):965–83. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/107/6/965/4994271>
15. Karl JP, Meydani M, Barnett JB, Vanegas SM, Barger K, Fu X, et al. Fecal concentrations of bacterially derived vitamin K forms are associated with gut microbiota composition but not plasma or fecal cytokine concentrations in healthy adults. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2017 Oct [cited 2019 Apr 22];106(4):1052–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28814395>

16. Arrieta M-C, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM, Finlay B. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Front Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2019 Jan 14];5:427. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25250028>
17. Berger A, Mainou B. Interactions between Enteric Bacteria and Eukaryotic Viruses Impact the Outcome of Infection. *Viruses* [Internet]. 2018;10(1):19. Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4915/10/1/19>
18. Harris VC, Haak BW, Handley SA, Jiang B, Velasquez DE, Hykes BL, et al. Effect of Antibiotic-Mediated Microbiome Modulation on Rotavirus Vaccine Immunogenicity: A Human, Randomized-Control Proof-of-Concept Trial. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2018 Aug 8 [cited 2019 Jan 14];24(2):197-207.e4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30092197>
19. Pfeiffer JK, Virgin HW. Viral immunity. Transkingdom control of viral infection and immunity in the mammalian intestine. *Science* [Internet]. 2016 Jan 15 [cited 2018 Jun 7];351(6270). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26816384>
20. WHO. OMS | Enfermedades diarreicas. WHO [Internet]. 2017 [cited 2018 Jan 8]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
21. Abou-Nader A, Sauer M, Steele AD, Tate JE, Atherly D, Parashar UD, et al. Global Rotavirus Vaccine Introductions and Coverage: 2006 – 2016. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2018 May 22 [cited 2018 Jun 7];1–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29787334>
22. Instituto Nacional de Salud Publica. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición [Internet]. 2012 [cited 2018 Jan 9]. Available from: <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
23. WHO. WHO | Estimated rotavirus deaths for children under 5 years of age: 2013, 215 000. WHO [Internet]. 2016 [cited 2018 Jan 8]; Available from: [http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/estimates/rotavirus/en/](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/rotavirus/en/)
24. Dennehy PH. Rotavirus vaccines: An overview. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(1):198–208.

25. Esparza-Aguilar M, Bautista-Márquez A, González-Andrade M del C, Richardson-López-Collada VL. Mortalidad por enfermedad diarreica en menores, antes y después de la introducción de la vacuna contra el rotavirus. *Salud Publica Mex.* 2009;51(4):285–90.
26. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017 Nov 9 [cited 2019 Apr 22];3:17083. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29119972>
27. Il VI, Priluckiy KY. Rotavirus Infection in Children as of Today (Literature Review).
28. Fischer DD, Kandasamy S, Paim FC, Langel SN, Alhamo MA, Shao L, et al. Protein Malnutrition Alters Tryptophan and Angiotensin-Converting Enzyme 2 Homeostasis and Adaptive Immune Responses in Human Rotavirus-Infected Gnotobiotic Pigs with Human Infant Fecal Microbiota Transplant. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2017 Aug [cited 2018 Jun 11];24(8). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28637803>
29. Díaz-Salinas MA, Romero P, Espinosa R, Hoshino Y, López S, Arias CF. The spike protein VP4 defines the endocytic pathway used by rotavirus to enter MA104 cells. *J Virol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2018 Jun 11];87(3):1658–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23175367>
30. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017 Nov 9 [cited 2019 Mar 11];3:17083. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29119972>
31. Arnold MM, Patton JT. Rotavirus antagonism of the innate immune response. *Viruses* [Internet]. 2009 [cited 2019 Jun 12];1(3):1035–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994581>
32. M. GS ;López. Mecanismos de entrada de virus: la manera de conocer la célula. [Internet]. Vol. 13, Mecanismos de entrada de virus: la manera de conocer la célula. División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2010 [cited 2018 Jun 11]. 26–34 p. Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-888X2010000100003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2010000100003)

33. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection HHS Public Access. 2018 [cited 2019 Sep 9]; Available from: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/148901/Rotavirus-infection.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
34. Srivastava A, Bolia R. Regional Genotyping of Rotavirus: Role in Vaccine Development. *Indian J Pediatr* [Internet]. 2018 May 7 [cited 2018 Jun 11];85(5):337–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12098-018-2648-6>
35. Schael IP, González R, Belén BS, Merly S, María V, Juan T, et al. Rotavirus: control y vacunas Title: Rotavirus: control and vaccines [Internet]. [cited 2019 Jan 9]. Available from: [http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE\\_3500.pdf](http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_3500.pdf)
36. Esquivel FR, Lopez S, Guitierrez-X L, Arias C. The internal rotavirus protein VP6 primes for an enhanced neutralizing antibody response. *Arch Virol* [Internet]. 2000 [cited 2019 Sep 10];145(4):813–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10893159>
37. Lopez-Guerrero D V., Meza-Perez S, Ramirez-Pliego O, Santana-Calderon MA, Espino-Solis P, Gutierrez-Xicotencatl L, et al. Rotavirus Infection Activates Dendritic Cells from Peyer's Patches in Adult Mice. *J Virol* [Internet]. 2010 Feb [cited 2018 Jun 11];84(4):1856. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007263>
38. Domínguez A, Astray J, Castilla J, Godoy P, Tuells J, Barrabeig I. Falsas creencias sobre las vacunas. *Atención Primaria* [Internet]. 2019 Jan [cited 2019 Jun 10];51(1):40–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0212656718302750>
39. Makgatho E, Patel F, Solomon F, Groome MJ, Lala SG, Vallabh P, et al. The Burden of Acute Diarrheal Disease in Young Hospitalized Urban South African Children Five Years After Rotavirus Vaccine Introduction. *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. 2019 Apr 10 [cited 2019 Apr 22];1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30985514>
40. OMS | Rotavirus: inmunización, vacunas y productos biológicos. WHO [Internet]. 2016 [cited 2019 Apr 22]; Available from: <https://www.who.int/immunization/diseases/rotavirus/es/>
41. Secretaria de Salud. Vacuna Antirrotavirus [Internet]. 2015 [cited 2019 Apr 22]. Available

from: <https://www.gob.mx/salud/articulos/vacuna-antirrotavirus>

42. Ward RL, Bernstein DI, Plotkin S. Rotarix: A Rotavirus Vaccine for the World. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009 Jan 15 [cited 2019 Apr 22];48(2):222–8. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/595702>
43. Praharaj I, John SM, Bandyopadhyay R, Kang G. Probiotics, antibiotics and the immune responses to vaccines. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 2015 Jun 19 [cited 2019 Apr 22];370(1671). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25964456>
44. Ward RL, McNeal MM, Sheridan JF. Development of an adult mouse model for studies on protection against rotavirus. *J Virol* [Internet]. 1990 [cited 2018 Jun 11];64(10):5070. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC247999/>
45. Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, Grcic V, Jahnsen FL, Gaustad P, et al. Depletion of Murine Intestinal Microbiota : Effects on Gut Mucosa and Epithelial Gene Expression. 2011;6(3):1–13.
46. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 May [cited 2018 Jun 11];9(5):313–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19343057>
47. Belkaid Y, Hand T. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. [cited 2018 Jun 11]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4056765/pdf/nihms579635.pdf>
48. Bene K, Varga Z, Petrov VO, Boyko N, Rajnavolgyi E. Gut Microbiota Species Can Provoke both Inflammatory and Tolerogenic Immune Responses in Human Dendritic Cells Mediated by Retinoic Acid Receptor Alpha Ligation. *Front Immunol* [Internet]. 2017 [cited 2018 Jun 11];8:427. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28458670>
49. Ponziani FR, Zocco MA, D’Aversa F, Pompili M, Gasbarrini A. Eubiotic properties of rifaximin: Disruption of the traditional concepts in gut microbiota modulation. *World J Gastroenterol*. 2017;23(25):4491–9.
50. Novoa-Farías O, Frati-Munari AC, Peredo MA, Flores-Juárez S, Novoa-García O, Galicia-

- Tapia J, et al. Susceptibilidad de las bacterias aisladas de infecciones gastrointestinales agudas a la rifaximina y otros agentes antimicrobianos en México. *Rev Gastroenterol Mex* [Internet]. 2016;81(1):3–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmx.2015.07.003>
51. ROSSIGNOL J-F, EL-GOHARY YM. Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2006 Nov 1 [cited 2018 Jan 7];24(10):1423–30. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2036.2006.03128.x>
  52. R R-C, JI G-R, Feregrino R-, Navarrete-Cadena ||, Resumen E. Estudio para evaluar la eficacia y seguridad de la nitazoxanida en el tratamiento de las parasitosis intestinales. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* [Internet]. 2017 [cited 2018 Jan 6];64(2):73–8. Available from: [www.medigraphic.com/patologiaclinica](http://www.medigraphic.com/patologiaclinica)
  53. Musher DM, Logan N, Hamill RJ, DuPont HL, Lentnek A, Gupta A, et al. Nitazoxanide for the Treatment of *Clostridium difficile* Colitis. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2006;43(4):421–7. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/506351>
  54. Teran CG, Teran-Escalera CN, Villarroel P. Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. *Int J Infect Dis*. 2009;13(4):518–23.
  55. Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica. NEOMICINA EN VADEMECUM [Internet]. 2013 [cited 2018 Jan 8]. Available from: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/n013.htm>
  56. Rondón Lugo, Antonio, Roye, Rosanelly, Salazar, Arévalo, Infante, Carmen, Linares, Miriam, Sesto, Daniel, Durán, Yarima, Placencio, Germán, Velázquez de Campos O. Estudio comparativo de la efectividad, tolerabilidad y seguridad de furoato de mometasona en combinación con mupirocina y clotrimazol (DermaQ®) vs la combinación dexametasona, neomicina y clotrimazol (Baycuten®) en sujetos con procesos inflamatorios de pi. *Arch Venez Farmacol y Ter* [Internet]. 2013; Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/506351>

57. UNAM Facultad de medicina. Ampicilina Cápsulas [Internet]. [cited 2018 Jan 9]. Available from: [http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi\\_2k8/prods/PRODS/17.HTM](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/17.HTM)
58. Zolezzi A. Antibióticos en Gastroenterología [Internet]. Revista de Gastroenterología de Perú. 1997 [cited 2018 Jan 9]. Available from: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bVrevistas/gastro/Vol\\_17S1/antibio\\_gastro.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bVrevistas/gastro/Vol_17S1/antibio_gastro.htm)
59. Castro-Mejía JL, Jakešević M, Fabricius NF, Krych Ł, Nielsen DS, Kot W, et al. Gut microbiota recovery and immune response in ampicillin-treated mice. *Res Vet Sci* [Internet]. 2018 Jun [cited 2019 Jan 9];118:357–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29653396>
60. Sanchez-Delgado J, Miquel M. Papel de la rifaximina en el tratamiento de la encefalopatía hepática. *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2016;39(4):282–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gastrohep.2015.08.003>
61. Weber D, Oefner PJ, Dettmer K, Hiergeist A, Koestler J, Gessner A, et al. Rifaximin preserves intestinal microbiota balance in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(8):1087–92.
62. Xu D, Gao J, Gilliland M, Wu X, Song I, Kao JY, et al. Rifaximin alters intestinal bacteria and prevents stress-induced gut inflammation and visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology* [Internet]. 2014;146(2):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.026>
63. Soldi S, Vasileiadis S, Uggeri F, Campanale M, Morelli L, Fogli MV, et al. Modulation of the gut microbiota composition by rifaximin in non-constipated irritable bowel syndrome patients: a molecular approach. *Clin Exp Gastroenterol* [Internet]. 2015;8:309–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26673000>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4675645>
64. Begovic B, Ahmedtagic S, Calkic L, Vehabović M, Kovacevic SB, Catic T, et al. Open Clinical Trial on Using Nifuroxazide Compared to Probiotics in Treating Acute Diarrhoeas in Adults. *Mater Sociomed* [Internet]. 2016 Dec [cited 2018 Jun 7];28(6):454–8. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28144199>
65. Vademecum. Nifuroxazida [Internet]. 2015 [cited 2018 Jun 7]. p. 1. Available from:  
<https://www.vademecum.es/principios-activos-nifuroxazida-a07ax03>
  66. Facultad de Medicina UNAM. SSA catálogo de medicamentos genericos. Vancomicina [Internet]. 2007 [cited 2019 Jan 14]. p. 1–22. Available from:  
[http://www.facmed.unam.mx/bmd/gi\\_2k8/prods/PRODS/Vancomicina.htm](http://www.facmed.unam.mx/bmd/gi_2k8/prods/PRODS/Vancomicina.htm)
  67. Agustín J, Quesada A. Actualización Médica Periódica [Internet]. [cited 2019 Jan 9]. Available from: [www.ampmd.com](http://www.ampmd.com)
  68. Haak BW, Lankelma JM, Hugenholtz F, Belzer C, de Vos WM, Wiersinga WJ. Long-term impact of oral vancomycin, ciprofloxacin and metronidazole on the gut microbiota in healthy humans. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2018 Nov 12 [cited 2019 Jan 9]; Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30418539>
  69. Dogra PM, Bhatt AK, Agarwal SK, Bhowmik D. Short-course metronidazole-induced reversible acute neurotoxicity in a renal transplant recipient. *Saudi J Kidney Dis Transpl* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 9];29(6):1511–4. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30588989>
  70. Facultad de Medicina UNAM. SSA. Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables. METRONIDAZOL [Internet]. 2007 [cited 2019 Jan 9]. p. 31–3. Available from:  
[http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi\\_2k8/prods/PRODS/123.HTM](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/123.HTM)
  71. Bendesky A, Menéndez D. Metronidazol: una visión integral. 2001;44(6):255–9.
  72. Lankelma JM, Cranendonk DR, Belzer C, Vos AF De, Vos WM De, Poll T Van Der, et al. Antibiotic-induced gut microbiota disruption during human endotoxemia : a randomised controlled study. 2016;1–8.
  73. Facultad de Medicina UNAM. SSA. Catalogo de medicamentos genéricos. Ciprofloxacino Tabletetas [Internet]. 2005 [cited 2019 Jan 9]. p. 39. Available from:  
[http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi\\_2k8/prods/PRODS/45.HTM](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/45.HTM)
  74. Abel Tobías Suárez Olivares M, Vivian Vera Vidal M, Bruno Zayas Alfonso J.

FARMACOLOGÍA CLÍNICA Uso y abuso del ciprofloxacino Ciprofloxacin use and overuse [Internet]. Vol. 15, MEDISAN. 2011 [cited 2019 Jan 9]. Available from: [http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol\\_15\\_3\\_11/san18311.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol_15_3_11/san18311.pdf)

75. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota , as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. 2008;6(11).
76. Parker EP, Ramani S, Lopman BA, Church JA, Iturriza-Gómara M, Prendergast AJ, et al. Causes of impaired oral vaccine efficacy in developing countries. *Future Microbiol* [Internet]. 2018 Jan 8 [cited 2019 Jun 10];13(1):97–118. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb-2017-0128>
77. Hashim ASM, Aboshanab KMA, El-Sayed AFM. Developing an Inactivated Rotavirus Vaccine and Evaluating the Immunogenicity Against a Commercially Available Attenuated Rotavirus Vaccine Using a Mice Animal Model. *Viral Immunol* [Internet]. 2016 Dec [cited 2019 Jun 10];29(10):565–71. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vim.2016.0073>

## **ANEXO I**

**Participación en eventos académicos.**



La Sociedad Mexicana de Virología y la Asociación Mexicana de Bioseguridad otorgan la presente

## CONSTANCIA

a **SÁMANO ROMÁN TONANTZI GUADALUPE**, Balbuena Sánchez Ricardo A, García Trejo Karla A., Esquivel Guadarrama Fernando R, López- Guerrero Delia V.

por su valiosa exposición del trabajo libre en **PRESENTACIÓN ORAL** intitulado  
*Association of the gut microbiota in the development of rotavirus infection in a murine model.*

presentado en el **XI CONGRESO NACIONAL DE VIROLOGÍA**

que tuvo lugar del 4 al 7 de septiembre de 2019 en los Espacios Magnos de la Universidad de Guanajuato.  
Ciudad de Guanajuato, Guanajuato, México, a 7 de septiembre de 2019.

**Dr. Ramón González García Conde**  
Presidente  
**Sociedad Mexicana de Virología AC**  
Folio: XICNV-CONF38



**QFB Lissete Valenzuela Fabris**  
Presidenta  
**Asociación Mexicana de Bioseguridad AC**

## Sámano Román Tonantzi Guadalupe

"Asociación de la fracción no bacteriana de la microbiota intestinal con la etiología y desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 en un modelo murino"



Otorgan la presente  
CONSTANCIA a:

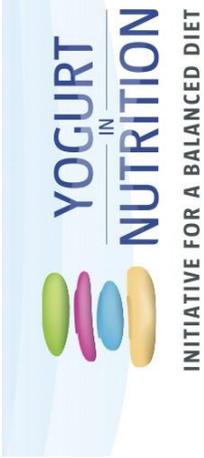
**LIC. NUT. TONANTZI GUADALUPE SÁMANO ROMÁN**

Por su asistencia al NUTRITION FORUM 2019

Realizado los días 13 y 14 de Febrero del 2019  
en el Centro de Convenciones WTC, CDMX, México

Dr. Armando R. Tovar Palacio  
Presidente, Instituto Danone de México

Con reconocimiento del **Consejo Mexicano de Gastroenterología, A.C.**,  
con registro, **CMG-19-09**; con valor de 15 puntos para recertificación de "Actividades de Educación Médica Continua"



Otorgan la presente  
CONSTANCIA a:

**TONANTZI GUADALUPE SÁMANO ROMÁN**

---

Por su asistencia al 4to Simposium:

**“Iniciativa para una Dieta Correcta: Lácteos, Alimentos Fermentados y su interacción con la Microbiota Intestinal”.**

Realizado el 16 febrero de 2018 en el Centro de Convenciones (WTC),  
Ciudad de México, México.

---

**Dr. Armando R. Tovar Palacio**  
**Presidente, Instituto Danone de México**



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

La Facultad de Química  
y el Instituto Nacional de Medicina Genómica  
otorga la presente



# CONSTANCIA <sup>a</sup> Sámano Román Tonantzi Guadalupe

por su asistencia al  
**COLOQUIO**

**Obesidad y metabolismo: genómica, dieta  
y microbiota intestinal,**  
realizado los días 26 y 27 de febrero de 2019.

"Por mi raza hablará el espíritu"  
Ciudad de México, febrero de 2019

Dr. Xavier Soberón Mainero  
Director del Instituto Nacional de Medicina Genómica

Dr. Jorge Vázquez Ramos  
Director de la Facultad de Química



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



**FORMATO 3A**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.  
Formato. Voto Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE  
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS  
DE LA NUTRICIÓN  
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) **LN. Tonantzi Guadalupe Sámano Román**, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula **10010411**, y que lleva por título **“Participación de la microbiota intestinal en el desarrollo de la infección por rotavirus y la protección inducida por la vacuna oral monovalente”** ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.**

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama  
Sinodal (Titular).

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 22 días del mes de Octubre de 2019.



**FORMATO 3A**

Formato 3 A

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.  
Formato. Voto Sinodal.**

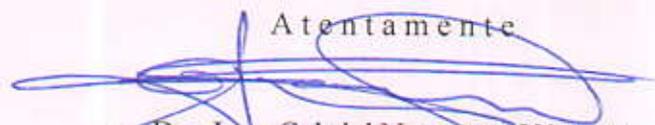
**COMISIÓN ACADÉMICA DE  
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS  
DE LA NUTRICIÓN  
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) **LN. Tonantzi Guadalupe Sámano Román**, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula **10010411**, y que lleva por título **“Participación de la microbiota intestinal en el desarrollo de la infección por rotavirus y la protección inducida por la vacuna oral monovalente”** ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente



Dr. Juan Gabriel Navarrete-Vázquez  
Sinodal (Suplente 2)

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 3 días del mes de Octubre de 2019



**FORMATO 3A**

Formato 3 A

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.  
Formato. Voto Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE  
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS  
DE LA NUTRICIÓN  
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) **LN. Tonantzi Guadalupe Sámano Román**, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula **10010411**, y que lleva por título **“Participación de la microbiota intestinal en el desarrollo de la infección por rotavirus y la protección inducida por la vacuna oral monovalente”** ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

  
Dra. América Ivette Barrera Molina  
Sinodal (Secretaria)

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 23 días del mes de septiembre de 2019.



**FORMATO 3A**

Formato 3 A

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.  
Formato. Voto Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE  
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS  
DE LA NUTRICIÓN  
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) **LN. Tonantzi Guadalupe Sámano Román**, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula **10010411**, y que lleva por título **“Participación de la microbiota intestinal en el desarrollo de la infección por rotavirus y la protección inducida por la vacuna oral monovalente”** ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.**

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dr. Ramón González García-Conde  
Sinodal (Presidente)

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 8 días del mes de OCTUBRE de 2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE NUTRICIÓN

**FORMATO 3A**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.  
Formato. Voto Sinodal.**

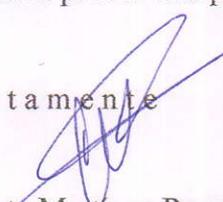
**COMISIÓN ACADÉMICA DE  
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS  
DE LA NUTRICIÓN  
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) **LN. Tonantzi Guadalupe Sámano Román**, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula **10010411**, y que lleva por título **“Participación de la microbiota intestinal en el desarrollo de la infección por rotavirus y la protección inducida por la vacuna oral monovalente”** ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.**

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

  
Dra. Ollín Celeste Martínez Ramírez  
Sinodal (Suplente 1).

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 24 días del mes de Octubre de 2019.