



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y  
APLICADAS**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
DINÁMICA CELULAR**

**“EVALUACIÓN DE ADYUVANTES PARA INDUCIR  
PROTECCIÓN CONTRA LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS EN  
UN MODELO MURINO DE VACUNACIÓN INTRANASAL”**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

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

**L.C. EDGAR ALEJANDRO ALVAREZ TELLO**

**ASESOR ACADÉMICO:  
DR. FERNANDO ESQUIVEL GUADARRAMA**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**MAYO, 2018**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología Viral de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Comité de sinodales:

Dr. Jesús Martínez Barnetche

*Presidente*

Centro de investigación Sobre Enfermedades Infecciosas  
Instituto Nacional de Salud Pública

Dra. Angélica Santana Calderón

*Secretaria*

Centro de Investigación en Dinámica Celular  
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez

*Sinodal 1*

Centro de Investigación en Dinámica Celular  
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Dr. Tomás López Díaz

*Sinodal 2*

Instituto de Biotecnología  
Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

*Sinodal 3*

Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

## **Agradecimientos**

A la Dra. Gabriela Rosas y la Dra. Gladis Fragoso quienes amablemente donaron la toxina de Cólera.

A la Dra. Lourdes Gutiérrez por donar los ratones y el adyuvante CpG ODN1826.

Al Dr. Oscar Badillo, el cDr. Herbey Padilla, la Dra. Roberta Salinas y al jurado evaluador de tesis por sus aportaciones, asesoría técnica y consejos prácticos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría otorgada durante la realización de este proyecto, con número de registro 585211.

## Resumen

Estudios previos en ratones mostraron que la administración intranasal de subunidades virales de rotavirus y de la toxina termolábil modificada de *E.coli* o toxina de Cólera como adyuvante redujo los niveles de excreción viral posterior al reto con rotavirus hasta en un 99%. En este trabajo, se investigó si otros adyuvantes y un péptido sintético correspondiente a la secuencia de aminoácidos 287-304 de la proteína estructural VP6 de rotavirus, podían replicar estos resultados y a través de qué mecanismos. El objetivo fue evaluar la capacidad protectora de este péptido en conjunto de los agonistas de TLR3, TLR4 y TLR9. Los resultados no mostraron una reducción en el título de excreción viral posterior al reto con rotavirus. Sin embargo, el péptido sintético de VP6 no estuvo degradado y los agonistas de TLRs funcionaron como adyuvantes. Estos resultados no descartaron una degradación *in vivo*, ya que en la mucosa nasal existen abundantes nucleasas. Además, no se encontró diferencia entre los grupos tratados y control en el número absoluto y los porcentajes (5-15%) de células T CD4<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> de la población de linfocitos intraepiteliales intestinales. Finalmente, se aislaron muestras enriquecidas con células epiteliales intestinales o con linfocitos intraepiteliales intestinales en una cinética de infección con rotavirus; se encontró que las muestras del segundo día post-infección expresaron el mRNA de IFN-λ 2/3. En nuestro conocimiento, la producción de IFN-λ 2/3 en linfocitos intraepiteliales intestinales en respuesta a la infección con rotavirus no se había reportado.

## Acrónimos

Todos los acrónimos que se emplearon en el presente escrito provienen del idioma inglés.

**AMP:** péptidos antimicrobianos

**BM-DCs:** células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón

**CpGODN1826:** oligodeoxinucleótidos (ODN) con secuencias CpG sin metilar

**CSR:** recombinación del cambio de clase

**CT:** toxina de Cólera

**DLP:** partícula viral de doble capa

**dsRNA:** RNA de doble cadena

**EDIM:** diarrea epizoótica de ratones infantiles

**ER:** retículo endoplasmático

**GALT:** tejido linfoide asociado a intestino

**IEC:** células epiteliales intestinales

**IEL:** linfocitos intraepiteliales intestinales

**IESC:** células madre epiteliales intestinales pluripotentes

**IgA:** inmunoglobulina A

**ILC:** células innatas linfoides

**i.n.:** intranasal

**ISG:** genes estimulados por interferon

**MHC:** complejo principal de histocompatibilidad

**MLN:** nódulo linfático mesentérico

**mRNA:** RNA mensajero

**NLR:** receptor tipo NOD

**NSP:** proteína no estructural de rotavirus

**LP:** lámina propia

**LPL:** linfocitos de lámina propia

**LPS:** lipopolisacárido

**LT (R192G):** toxina termolábil modificada de *E.coli* (arginina 192 por glicina)

**poly IC:** ácido poliribonucleotídico poliribocitidílico

**poly ICLC:** poly IC poly lisina carboximetil celulosa

**PP:** placa de Peyer

**RLR:** receptor tipo RIG-I

**TCR:** receptor de célula T

**TLA:** antígeno de leucemia en timo

**TLP:** partícula viral de triple capa

**TLR:** receptor tipo Toll

## Figuras

**Figura 1. Virión de rotavirus.**

**Figura 2. Barrera de la mucosa Intestinal.**

**Figura 3. Esquema de inoculación intranasal y reto con rotavirus.**

**Figura 4. Efecto de la inoculación i.n. con VP6<sub>287-304</sub> y CT en la excreción viral y en la producción de IgA intestinal posterior al reto con rotavirus.**

**Figura 5. Efecto de la inoculación i.n. con VP6<sub>287-304</sub> y los agonistas de TLR3, TLR4 y TLR9 en la excreción viral y en la producción de IgA intestinal posterior al reto con rotavirus.**

**Figura 6. Integridad del péptido sintético VP6<sub>287-304</sub> (2 KDa).**

**Figura 7. Efecto sobre células dendríticas derivadas de medula ósea en respuesta a ligandos de TLR.**

**Figura 8. Células T CD4<sup>+</sup> en la población intraepitelial de ratones inoculados de manera i.n. con VP6<sub>287-304</sub> y poly IC.**

**Figura 9. Expresión de IFN-λ 2/3 en muestras enriquecidas con IEC o IEL durante la cinética de infección con rotavirus.**

# Índice

|   |    |
|---|----|
| Capítulo 1. Introducción.....   | 10 |
| 1.1 Antecedentes .....  | 11 |
| 1.2 Planteamiento del problema .....  | 14 |
| Capítulo 2. Marco teórico.....  | 15 |
| 2.1 Estrategias de vacunación y adyuvantes.....   | 15 |
| 2.2 Rotavirus .....   | 16 |
| 2.2.1 Epidemiología por rotavirus .....   | 19 |
| 2.2.2 Patogénesis e inmunidad por rotavirus .....   | 20 |
| 2.2.3 Vacunas contra rotavirus.....   | 22 |
| 2.3 Sistema inmune de mucosa intestinal .....   | 25 |
| 2.4 Linfocitos intraepiteliales de intestino.....   | 29 |
| 2.4.1 IEL tipo-a.....   | 31 |
| 2.4.2 IEL tipo-b .....  | 32 |
| 2.5 Justificación .....   | 34 |
| 2.6 Pregunta de investigación.....  | 35 |
| 2.7 Hipótesis.....  | 35 |
| 2.8 Objetivos.....  | 35 |
| 2.8.1 Objetivo general.....   | 35 |
| 2.8.2 Objetivos particulares .....  | 36 |
| Capitulo 3. Metodología.....  | 37 |
| 3.1 Animales .....  | 37 |
| 3.2 Medios y reactivos.....   | 37 |
| 3.3 Virus .....   | 37 |
| 3.4 Péptido sintético .....   | 38 |
| 3.5 Inmunización de los animales.....   | 38 |
| 3.6 Infección de los animales .....   | 39 |
| 3.7 Detección del antígeno viral y de la IgA intestinal .....   | 39 |
| 3.8 Determinación de la reducción de la excreción viral.....  | 40 |
| 3.9 Células dendríticas derivadas de medula ósea de ratón y su estimulación con agonistas de TLRs ..... | 40 |
| 3.10 Aislamiento de IEC y IEL.....  | 41 |

|   |    |
|---|----|
| 3.11 Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA.....   | 41 |
| 3.12 Análisis de la expresión del mRNA de IFN- $\lambda$ 2/3 y $\beta$ -actina .....  | 42 |
| 3.13 Anticuerpos y citofluorometría de flujo.....   | 43 |
| 3.14 Análisis estadístico .....   | 43 |
| Capítulo 4. Resultados y Discusión.....   | 44 |
| 4.1 Inducción de protección en ratones contra la infección por rotavirus con la<br>inoculación i.n. de VP6 <sub>287-304</sub> y CT..... | 44 |
| 4.2 Efecto en ratones de la inoculación i.n. de VP6 <sub>287-304</sub> y los agonistas de TLR3, TLR4 y<br>TLR9.....                     | 46 |
| 4.3 Efecto en IEC y IEL y en la población de células T CD4 <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup> en respuesta a rotavirus<br>.....            | 50 |
| Capítulo 6. Conclusiones .....  | 54 |
| Bibliografía.....   | 55 |

## Capítulo 1. Introducción

La vacunación es uno de los logros más influyentes en la historia de la medicina y representa la práctica inmunológica más exitosa y con mayor relación costo-beneficio que aumenta la calidad de vida y la salud de los humanos. Las primeras vacunas tuvieron un tremendo éxito para proteger a la población humana en contra de una variedad de enfermedades, tales como viruela, polio, sarampión, tos ferina, rubeola, difteria, tétanos, parotiditis y fiebre amarilla. Estas vacunas utilizaron patógenos vivos o atenuados para inducir inmunidad adaptativa [1]. Sin embargo, la reactivación de patógenos atenuados y la presencia latente de oncogenes en éstos conlleva a cuestiones de bioseguridad importantes [2]. Por lo tanto, las toxinas inactivadas, las proteínas recombinantes y los péptidos sintéticos son considerados como antígenos necesarios para el diseño de mejores vacunas [3]. Sin embargo, estos antígenos son poco inmunogénicos y se deben administrar con adyuvantes para potenciar la capacidad de inmunización, pero a menudo los adyuvantes disponibles son demasiado tóxicos para su uso en humanos.[3]. Por otro lado, y debido a que muchos patógenos infectan a través de las superficies mucosas, existe un creciente interés por generar inmunidad *in situ*, mediante la vacunación vía mucosa. Actualmente, sólo un puñado de vacunas vía mucosa están disponibles para su uso en humanos y la mayoría de ellas contiene microorganismos atenuados; además, los mecanismos inmunológicos involucrados en protección son desconocidos. Todo lo anterior, representa en la disciplina de la Inmunología un desafío formidable para el desarrollo de vacunas eficientes contra los

patógenos de mucosas. Un ejemplo sobresaliente entre estos patógenos es rotavirus, un parasito intracelular obligado, que infecta células epiteliales de la mucosa intestinal y es una causa común de gastroenteritis aguda en humanos.

## 1.1 Antecedentes

Estudios previos en ratones mostraron que la inoculación intranasal (i.n.) de la proteína recombinante VP6 de rotavirus en conjunto de un adyuvante redujo la excreción viral posterior al reto con rotavirus hasta en un 99% [4-6]. En esta reducción no participaron los linfocitos B y linfocitos T CD8<sup>+</sup>, pero sí los linfocitos T CD4<sup>+</sup> [4, 7, 8]. Además, *in vitro* se demostró que los linfocitos CD4<sup>+</sup> re-estimulados con VP6 secretaron IFN- $\gamma$  e IL-17 [9, 10]. Sin embargo, los ratones deficientes en el receptor de alguna de estas citocinas mantuvieron una baja excreción viral [10]. Estos datos sugirieron que ambas citocinas son necesarias y/o apuntan hacia la participación y cooperación de otras citocinas. Además, se encontró que la inoculación i.n. del péptido sintético 287-304 de VP6 (VP6<sub>287-304</sub>) en conjunto de toxina de Cólera (CT) o el péptido sintético 289-302 de VP6 (VP6<sub>289-302</sub>) en conjunto de toxina termolábil modificada de *E. coli* [LT(R192G)], también redujo la excreción viral posterior al reto con rotavirus [11]. Estos péptidos de VP6 contienen un epítipo putativo de células T CD4<sup>+</sup> presentado en el contexto de la molécula del MHC clase II IE<sup>d</sup> [12]. Colectivamente, estos resultados mostraron que la inoculación i.n. de estas subunidades virales en conjunto de un adyuvante redujo sustancialmente la excreción viral posterior al reto con rotavirus.

Durante la infección primaria, las observaciones experimentales mostraron que los ratones deficientes en células B resolvieron la infección de manera similar a su contraparte inmunocompetente [13]. Asimismo, no existieron diferencias significativas entre los ratones control y los ratones deficientes en perforina, FAS e IFN- $\gamma$  [14]. Estos datos, mostraron que la eliminación de rotavirus no es exclusivamente dependiente de un mecanismo mediado por citotoxicidad, anticuerpos o una combinación de las anteriores. Sin embargo, los ratones Rag 2<sup>-/-</sup> (deficientes en células B y T) infectados con rotavirus no lograron eliminarlo y padecieron una infección crónica, lo que sugiere la participación de poblaciones linfoides, quizá de una manera no clásica [7].

Controversialmente, diferentes grupos de trabajo mostraron la participación de los interferones tipo I y III durante la infección con rotavirus. Un grupo demostró que el tratamiento sistémico de ratones lactantes con IFN- $\lambda$  recombinante reprimió la replicación de rotavirus en el intestino; mientras que el IFN- $\alpha$  tuvo un efecto mucho menos eficiente [15]. Esta diferencia se basó en que la expresión del receptor para IFN tipo I en IEC fue intrínsecamente baja y se encontró en la parte apical de estas células [15, 16]. Otro grupo, reportó que en respuesta a la infección primaria por rotavirus las IEC produjeron IFN- $\lambda$  que en sinergia con IL-22 reprimió la infección. Esto sucedió a través de un mecanismo dependiente de la activación de STAT1 y la expresión de genes estimulados por interferón (ISG), que indujeron un estado antiviral en IEC [17]. Mientras que, un tercer grupo señaló que los ratones lactantes deficientes en el receptor para IFN- $\lambda$ , IFN- $\alpha$  o el factor de transcripción STAT1, resolvieron la

infección por rotavirus de manera similar al grupo control [18]. Con respecto a estas diferencias, se señaló que un grupo sólo eliminó el exón 3 del receptor de IFN- $\lambda$ , mientras que, los otros dos eliminaron el gene completo (~20 kb) y lo remplazaron por un cassette o gene reportero (~5 kb). Esta manipulación genómica pudo afectar la expresión de otros genes adyacentes que comparten elementos coregulatorios, particularmente el gene *I122ra*, localizado río abajo del gene *Ifnlr1* y que codifica para una de las cadenas del receptor de IL-22. Además, se sugirió que la dieta de los animales, su microbiota e infecciones persistentes con norovirus o *Helicobacter pylori* pudieron alterar la respuesta intestinal innata antiviral y en consecuencia determinaron algunas de las diferencias observadas entre estos estudios. Sin embargo, con base en antecedentes en otras infecciones virales en mucosas, no descartamos la idea de que IFN- $\lambda$  tenga un papel importante para contrarrestar la infección por rotavirus [19, 20].

Finalmente, un estudio más reciente demostró que el inflamasoma constituido por la proteína NLRP9b en conjunto de el sensor de RNA DHX9, tuvo la capacidad de reconocer el dsRNA de rotavirus en las IEC infectadas y reprimió la infección por este virus [21].

Todos estos datos, en conjunto señalaron que la respuesta inmune innata iniciada por las IEC es muy importante durante la infección primaria por rotavirus. Sin embargo, los ratones inmunizados con VP6 o los péptidos derivados de éste, la protección que se generó es dependiente del fenómeno

clásico de memoria inmunológica, una función característica de la respuesta inmune adaptativa.

## **1.2 Planteamiento del problema**

En el modelo murino de i.n. con la proteína recombinante VP6 de rotavirus o los péptidos sintéticos derivados de éste se utilizaron como adyuvantes las enterotoxinas silvestres o mutantes de Cólera o *E. coli*. Este modelo mostró una reducción sustancial de la excreción viral posterior al reto con rotavirus y resultó una herramienta útil para el estudio de estrategias de vacunación, memoria inmunológica, respuesta monoclonal, protección independiente de anticuerpos e inmunología de mucosas, entre otras. Sin embargo, estos adyuvantes son caros y difíciles de importar por restricciones de bioseguridad. Además, debido a su elevada toxicidad, el uso de estos adyuvantes está prohibido en humanos.

## Capítulo 2. Marco teórico

### 2.1 Estrategias de vacunación y adyuvantes

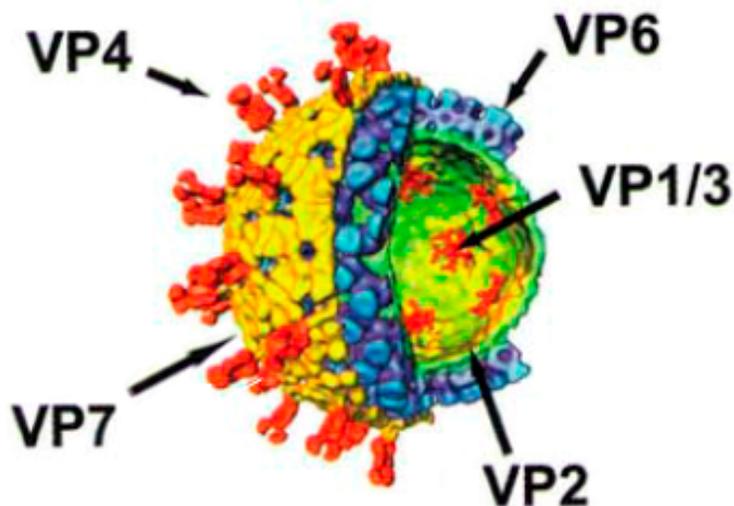
Las primeras estrategias de vacunación utilizaron patógenos vivos o atenuados para inducir inmunidad adaptativa [1]. Sin embargo, estas vacunas acarrearán riesgos importantes, como la replicación del microorganismo que pudiera generar infecciones en individuos vulnerables. Esta desventaja puede evitarse con el uso de patógenos inactivados o antígenos recombinantes; sin embargo, este tipo de antígenos son poco inmunogénicos debido a que carecen de estimuladores endógenos del sistema inmune y en muchos casos resulta necesario el uso de materiales complementarios que compensen esta limitación. Dichos materiales complementarios se denominan adyuvantes y su uso está destinado a mejorar la calidad, magnitud y duración de la respuesta inmune hacia un antígeno específico. Los adyuvantes se pueden dividir en dos categorías según su modo de acción: 1) entrega eficiente de materiales de vacunación; y 2) estimulación del sistema inmune [2]. Los adyuvantes que facilitan la administración de la vacuna incluyen: liposomas, nanogeles, emulsiones de aceite en agua y virosomas; y van dirigidos a las células presentadoras de antígenos [22]. Mientras que, los adyuvantes que estimulan el sistema inmune incluyen: moléculas que se unen a receptores intracelulares, por ejemplo, receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo Nod (NLR) y receptores tipo RIG-I (RLR) [2].

## 2.2 Rotavirus

Los rotavirus se descubrieron en 1973 en muestras histológicas de duodeno y en heces, como la partícula más abundante en infantes con gastroenteritis aguda no bacteriana [23, 24]. Las micrografías electrónicas de rotavirus muestran que éste posee una estructura en forma de rueda (de ahí su nombre).

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*, el virión de 70 nm es un icosaedro de tres capas concéntricas sin envoltura lipídica, y contiene un genoma de once segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) [25]. Cada segmento del genoma codifica para una proteína con excepción del segmento 11, que en algunas cepas de rotavirus posee dos marcos abiertos de lectura [26]. De las proteínas de rotavirus, seis son estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y forman la cápside (**Figura 1**); mientras que el resto son proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) [27]. La capa interna que envuelve el genoma viral está hecha principalmente por VP2, y en menor proporción por VP1 y VP3 [28]. La capa intermedia contiene exclusivamente VP6 y la capa externa está compuesta por VP7 y VP4. La proteína VP4 forma 60 espículas que se proyectan hacia la parte externa de la partícula viral. En presencia de tripsina (enzima pancreática), VP4 sufre un corte proteolítico de manera específica y genera dos fragmentos que permanecen asociados, el extremo C-terminal se denomina VP5 y el extremo N-terminal VP8 [28].

Existen al menos 8 grupos diferentes de rotavirus (desde A hasta H), basados en la seroreactividad hacia VP6. La mayoría de los rotavirus que infectan a los humanos pertenecen a la cepa del grupo A: con 27 tipos G (determinados por VP7, una glicoproteína) y 35 tipos P (determinados por VP4, una proteína sensible a proteasa) [29].



**Figura 1. Virión de rotavirus.** La figura muestra una representación esquemática del virión de rotavirus. La capa interna o núcleo rodea el genoma viral, y está formado por la proteína VP2, la RNA polimerasa VP1 y la guanil-metiltransferasa VP3. La capa intermedia contiene sólo a VP6 y la capa externa está compuesta por VP7 y VP4. Modificado de Desselberger et al., 2009.

El ciclo de replicación de rotavirus es un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que incluye: la entrada, activación de la transcripción, morfogénesis, lisis celular y liberación de progenie [30]. Este proceso se describió con modelos *in vitro*, principalmente en células de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2) y células de riñón de simio (MA104), entre otras [31]. El ciclo de replicación de

rotavirus inicia con la adhesión y entrada de la partícula viral de triple capa (TLP) a la célula huésped, a través de la proteína VP4 y la vía del endosoma temprano [32]. Los receptores asociados a la adhesión de rotavirus se ubican en la parte apical y basolateral de las células huésped, estos receptores incluyen: gangliosidos GM1 y GD1a, glicoconjugados no sialilados, integrinas, HSP 70, ocludina y la proteína de unión estrecha ZO-1, entre otros [33]. De acuerdo a la cepa de rotavirus, el virión es internalizado a través de la vía endocítica dependiente de clatrina o independiente de clatrina y caveolina [33]. Después de la separación de la capa externa debido a una baja concentración de  $Ca^{2+}$  dentro del endosoma, emergen hacia el citoplasma partículas transcripcionalmente activas de doble capa (DLP). El complejo viral de transcripción, compuesto por la RNA polimerasa dependiente de RNA (VP1) y la guanil-metiltransferasa (VP3), usa la cadena negativa de cada uno de los once segmentos dsRNA para generar RNAs mensajeros (mRNAs). Aunque los mRNAs de rotavirus poseen “cap” no son poliadenilados, en su lugar para sustituir la ausencia de una cola de poli-A, el grupo A de rotavirus utiliza una secuencia consenso (5'-GUGACC-3') en el extremo 3' [26]. Algunos de estos mRNAs son traducidos en proteínas virales, mientras que otros se localizan en inclusiones citoplasmáticas llamadas ‘*viroplasma*s’ en donde el producto de su replicación genera nuevas partículas subvirales [25]. Las proteínas NSP2 y NSP5 son los principales componentes de los viroplasma, y son necesarias para la replicación y morfogénesis temprana. Además, los viroplasma también contienen VP1, VP2, VP3, VP6 y en principio todos los mRNAs transcritos de los segmentos genómicos [25]. La replicación del genoma su empaquetamiento y la formación de la capa intermedia, generan

nuevas DLPs dentro de los viroplasmias [33]. Las nuevas DLPs se unen a NSP4, glicoproteína transmembranal de retículo endoplasmático (ER) que actúa como un receptor intracelular de VP6 y promueve el tránsito de partículas hacia el lumen del ER [26]. Finalmente, las DLPs geman a través del ER, donde maduran en TLPs al adquirir las proteínas de la cápside externa y luego emergen vía lisis en células no polarizadas (MA104), o vía exocitosis en células polarizadas (Caco-2) [25]. En muestras clínicas de heces se pueden observar TLPs, así como DLPs, y a menudo partículas virales vacías, es decir, sin RNA genómico [25].

### **2.2.1 Epidemiología por rotavirus**

La infección por rotavirus es una de las causas más comunes de gastroenteritis aguda en humanos y representa un serio problema de salud pública. El muestreo global estima que en un año 215,000 infantes menores de 5 años perdieron la vida al infectarse con este patógeno [34]. La estadística reporta un pico de infección entre seis y once meses de edad, pero casi la mitad de ellos era menor a los 6 meses, lo que señala una relación entre la infección con rotavirus y la etapa lactante. A pesar de ser más común en infantes, la infección con rotavirus también puede presentarse en niños y adultos, y muchas veces de manera asintomática. Los rotavirus principalmente se transmiten por el contacto de persona a persona a través de la vía fecal-oral y el periodo de incubación oscila entre 48 y 72 horas [35]. Por otro lado, el agua, las heces y ocasionalmente los alimentos contaminados actúan como vehículos de los rotavirus.

Mientras que en países con climas templados existen picos estacionales de infección (invierno/verano), en regiones tropicales las infecciones con rotavirus ocurren en cualquier época del año. En México, por ejemplo tiende a presentarse desde octubre hasta febrero y es en el mes de enero cuando se manifiesta con mayor frecuencia.

Por otra parte, los rotavirus infectan diferentes especies de mamíferos, incluso animales domésticos, lo cual puede representar pérdidas importantes en el sector pecuario. Y aunque los rotavirus son parásitos específicos a su hospedero, es decir, el virus que infecta una especie difícilmente lo hace con otra, se llegan a presentar casos de zoonosis [36].

### **2.2.2 Patogénesis e inmunidad por rotavirus**

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad abarcan desde diarrea moderada o abundante, hasta vómito y fiebre, y generalmente resultan en deshidratación severa. Las complicaciones y fatalidades están relacionadas exclusivamente a la deshidratación, aunque en algunos casos raros se reporta meningoencefalitis, miositis, hepatitis, púrpura trombocitopénica idiopática y parálisis similar a la de polio [37]. Sin embargo, la relación de estas enfermedades con rotavirus permanece indeterminada. Además, la infección con rotavirus también puede causar antigenemia y viremia en sangre y otros tejidos [38].

Rotavirus infecta células epiteliales en las puntas de las vellosidades intestinales; la replicación de este virus, ocasiona muerte celular y descamación

del epitelio [39]. La necrosis apical de las vellosidades infectadas reduce considerablemente la absorción de nutrientes y fluidos, incrementa la presión osmótica del lumen intestinal y causa diarrea por malabsorción [27].

Interesantemente, NSP4 es capaz de inducir diarrea en animales de laboratorio y es considerada como la única enterotoxina de origen viral [40]. Este efecto se debe a la liberación de NSP4 de las células necróticas y su interacción con el dominio I de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$ , y posiblemente con otros receptores presentes en la membrana plasmática de las células adyacentes [41]. La señalización dependiente de fosfolipasa C a través de estos receptores, incrementa la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular; que a su vez induce la secreción de  $\text{Cl}^-$  e inhibe la absorción de  $\text{Na}^+$  [42]. En consecuencia, este desbalance osmótico celular genera deshidratación. En adición a su papel como receptor intracelular de VP6, NSP4, funciona como una viroporina que libera  $\text{Ca}^{2+}$  del ER y altera la homeostasis de calcio celular [43]. Al perturbar la homeostasis de electrolitos, NSP4 desorganiza el citoesqueleto y las uniones estrechas, esto eleva la permeabilidad paracelular [30, 44]. Por otro lado, la infección con rotavirus induce la formación de fibras de estrés a través de un mecanismo dependiente de la GTPasa RhoA, esto también genera cambios en la permeabilidad [45].

En cuanto a la respuesta inmune inducida por rotavirus, se investiga principalmente en modelos animales (ratones, ratas, cerdos, conejos, etc.) infectados con cepas virales homólogas y heterólogas [46]. En el modelo murino, después de la infección con rotavirus homólogo, conocemos que: a) los linfocitos

T CD8<sup>+</sup> son importantes para eliminar la infección a corto plazo y conferir protección parcial contra la re-infección [13]; b) los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son esenciales para el desarrollo eficiente de la inmunoglobulina A virus-específica [7, 13] y c) los linfocitos B y en particular los anticuerpos son los principales mediadores en conferir protección contra rotavirus a largo plazo.

En ratón, se observan respuestas inmunes intestinales y sistémicas, debido a la capacidad de rotavirus para generar viremia. Sin embargo, sólo las células plasmáticas residentes del intestino tienen un efecto antiviral, esto sugiere que los anticuerpos proveen protección en este modelo animal sólo en mucosa pero no a nivel sistémico [47]. Además, la IgA específica contra rotavirus (en particular para las proteínas externas VP4 y VP7) participa al eliminar la infección primaria y confiere resistencia a la re-infección al prevenir la adsorción y penetración viral [48]. Interesantemente, los anticuerpos de clase IgA contra VP6 son capaces de conferir protección, posiblemente por una inhibición intracelular de rotavirus; y se sugiere que estos anticuerpos evitan la replicación no así la infección [46].

### **2.2.3 Vacunas contra rotavirus**

Actualmente existen varias vacunas orales contra rotavirus:

- a) Rotarix® (GlaxoSmithKline), vacuna monovalente derivada de una sola cepa atenuada de rotavirus humano, efectiva (85%) para prevenir una gastroenteritis severa y la hospitalización por infecciones asociadas a rotavirus [25]. Rotarix® está permitida en varios países como México,

Brasil, Venezuela y algunos países de Europa. En México, a partir de noviembre del 2006 el Instituto Mexicano del Seguro Social, incluyó esta vacuna dentro del esquema nacional básico de vacunación que consiste de dos dosis por vía oral. La primera dosis se debe administrar entre los 2 y 3 meses de edad y la segunda dosis dos meses posteriores a la primera dosis. El intervalo entre las dos dosis no debe ser inferior a las 4 semanas.

- b) RotaTeq<sup>®</sup> (Merk & Co. Inc.), vacuna pentavalente compuesta por rearrreglantes de rotavirus bovino-humano, contiene los genes de las principales cepas de los rotavirus que infectan humanos, tiene una alta eficiencia (98%) para prevenir la gastroenteritis severa y posee licencia de uso en EE. UU. [25].
- c) Rotasiil<sup>®</sup> (Serum Institute of India), vacuna pentavalente que contiene los serotipos G1, G2, G3, G4 y G9 en un rearrreglo de rotavirus bovino-humano, actualmente se encuentra en fase III de ensayo clínico. Tiene una menor eficacia (66.7%) para prevenir la gastroenteritis severa entre los infantes de Nigeria y una eficacia mucho menor (39.5%) en los infantes de India [49, 50]. Sin embargo, Rotasiil<sup>®</sup> posee la particularidad de ser estable hasta por 18 meses a 40°C, esto significa una clara ventaja en contra de errores en la cadena de frío que pudieran alterar los componentes de la vacuna y en consecuencia disminuir su eficacia [51].
- d) Rotavac<sup>®</sup> (Bharat Biotech), vacuna monovalente que incluye la cepa de neonato 116E de rotavirus y contiene un gene P de rotavirus bovino y 10 genes de rotavirus humano. Esta vacuna se administra en un régimen

de tres dosis y tiene una eficacia menor (56%) para prevenir la gastroenteritis severa, de acuerdo con un estudio clínico de fase III [52].

Sin embargo, la eficacia de estas vacunas es relativamente baja en países de África sub-sahariana y algunos países del sur de Asia [53]. Los motivos de ello, sugieren desde defectos en la cadena de frío, hasta diferencias en el estado nutricional de los individuos y su microbiota comensal [54, 55]. Inconvenientemente, las vacunas comerciales contra rotavirus están asociadas con un ligero riesgo de invaginación intestinal [56]. Esta patología es una forma de obstrucción, en donde una porción del intestino se invagina dentro de otra y termina en isquemia, edema y necrosis local del tejido [37]. Por otra parte, estas vacunas están hechas con virus atenuados y modificados que pueden desarrollar infecciones en individuos vulnerables; además, promueven el surgimiento de rearreglos entre la cepa vacunal y la cepa silvestre que resulten más virulentos y para las cuales no sean efectivas las vacunas actuales. Por lo tanto, existe una gran motivación para desarrollar nuevas y mejores vacunas contra rotavirus; sin embargo, es necesario implementar estrategias diferentes a las vacunas actuales. Por ejemplo: con virus inactivados, partículas pseudovirales, proteínas virales o subunidades de proteínas virales; en conjunto de un potente adyuvante [47]. Como estrategia, resulta fundamental contar con vacunas potenciales que puedan ser evaluadas primero en modelos animales y determinar los mecanismos responsables en otorgar inmunidad.

## 2.3 Sistema inmune de mucosa intestinal

El tracto gastrointestinal es la superficie mucosa más extensa del cuerpo humano, cubre un área superficial de 260 a 300m<sup>2</sup>, mientras que en ratón alcanza una superficie de 1.4 m<sup>2</sup> [57, 58]. Esta superficie se compone de una monocapa polarizada de células epiteliales intestinales (IEC), organizadas en criptas y vellosidades, y cuya característica principal es absorber nutrientes [59]. La monocapa epitelial permanece firmemente unida por medio de uniones estrechas que sellan el espacio basolateral para formar una barrera continua e impermeable que previene el transporte de iones y la translocación de antígenos [60]. Además, esta barrera provee una separación entre el interior estéril del organismo y el entorno externo rico en antígenos, que incluye antígenos de alimentos, microbiota comensal y microorganismos patógenos [61]. Continuamente esta superficie es renovada por células madre epiteliales intestinales pluripotentes (IESC) que residen en la base de las criptas y dan lugar a células maduras y diferenciadas en la punta de las vellosidades intestinales [62]. Fuera de la barrera epitelial, existe una densa y gruesa capa de moco que previene el contacto directo del epitelio con microorganismos y protege del desgaste y trauma físico de las partículas del lumen [63]. El principal componente estructural de la capa mucosa son las mucinas, glicoproteínas producidas ininterrumpidamente por IEC especializadas conocidas como células goblet [64]. Este gel viscoso está formado estructuralmente por dos estratos diferentes: una firme capa interna y una endeble capa externa [65]. En el colón, la capa interna excluye a la mayoría de las bacterias, mientras que la capa

externa sirve de hábitat para el ecosistema microbiano [66]. Además, la capa interna del gel mucoso sirve como soporte de varias enzimas digestivas, péptidos antimicrobianos e inmunoglobulinas [67]. Esto sugiere que la capa de moco protege la superficie epitelial al menos de dos maneras: primero, limita el acceso de microorganismos al epitelio, y segundo, forma una barrera que concentra péptidos antimicrobianos e inmunoglobulinas cerca de la superficie epitelial [68].

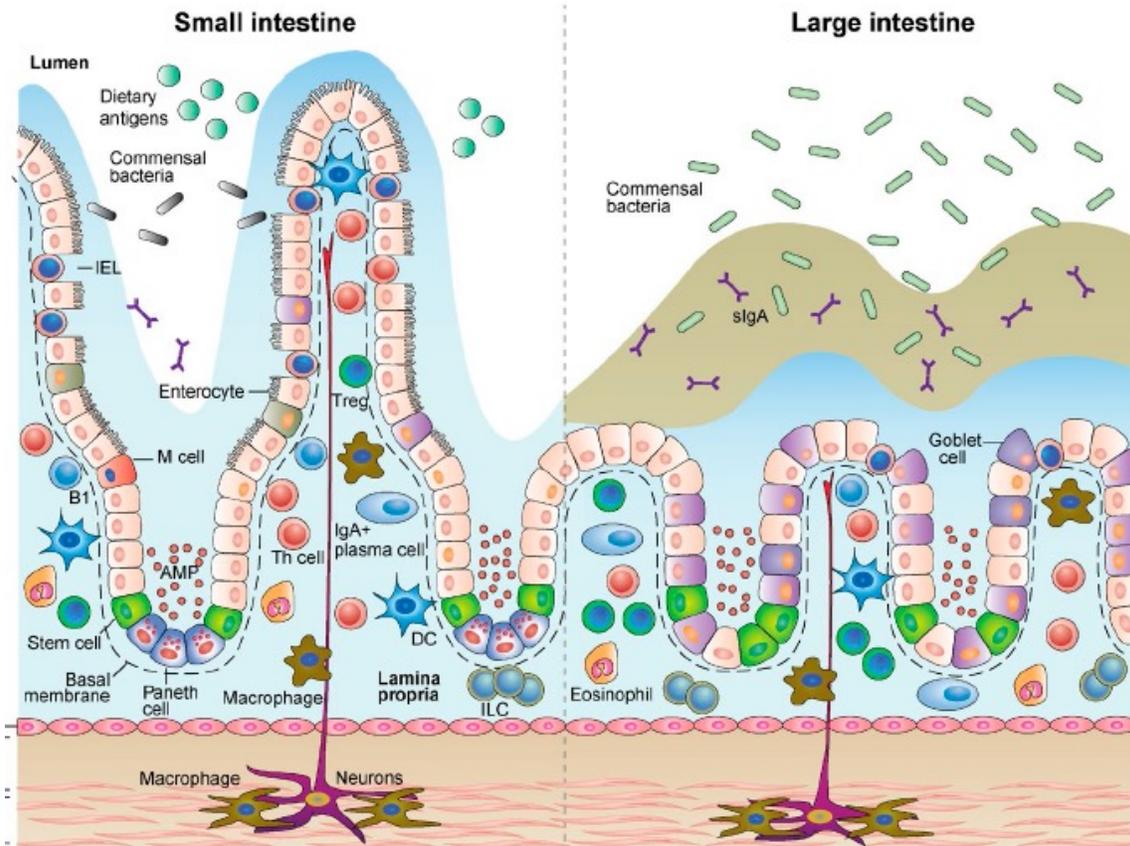
La inmunoglobulina A (IgA) es un componente clave que impide la penetración de microorganismos en el tejido intestinal. Esta inmunoglobulina es producida por las células plasmáticas residentes de lámina propia, en donde dímeros de IgA se unen al receptor polimérico de inmunoglobulina. Este receptor está presente en la cara basolateral de las IEC que mediante transitis transportan IgA e IgM hacia el lumen intestinal [62]. La maduración y diferenciación de células B a células plasmáticas productoras de IgA se produce a través de la recombinación del cambio de clase (CSR) de la cadena pesada. Esto depende principalmente de la presentación de antígeno por parte de las células dendríticas y la ayuda de las células T cooperadoras [69, 70]. La expresión del ligando de CD40 en células T cooperadoras es suficiente para inducir la CSR en células B. Sin embargo, en ausencia de células T CD4<sup>+</sup> la CSR puede ocurrir a través del estímulo con APRIL y BAFF, citocinas que son producidas por IEC en respuesta a bacterias comensales [71, 72].

Adicionalmente, las IEC actúan como centinelas del entorno microbiano mediante la expresión de diversos receptores presentes tanto en la superficie celular como dentro de distintos compartimentos celulares. Estos receptores

incluyen TLRs, NLRs y RLRs [62]. La expresión de este tipo de receptores en las IEC sugiere que poseen funciones que influyen en el inicio, la regulación y la dirección de las respuestas inmunes antimicrobianas [73].

La barrera de la mucosa intestinal, además, incluye diversos tipos celulares que contribuyen en la inmunidad como las células de Paneth, linfocitos B, linfocitos T, células plasmáticas, células cebadas, células dendríticas y macrófagos (**Figura 2**). Los diversos tipos celulares mantienen comunicación cruzada con las IEC y en conjunto generan un balance en la respuesta inmune dirigida contra antígenos intestinales y preservan la homeostasis del tejido [74].

El tejido linfoide asociado a intestino (GALT) puede dividirse en sitios inductores y efectores; que consisten de linfocitos dispersos a través del epitelio mucoso y que son responsables de la fase de inducción de la respuesta inmune y la tolerancia [75, 76]. Estos sitios son: i) la lámina propia (LP) que incluye macrófagos, células dendríticas, células plasmáticas, linfocitos de lámina propia (LPL), y neutrófilos, está situada justo debajo de la membrana basal de la vellosidad intestinal [77]; ii) el compartimiento intraepitelial, que contiene linfocitos intraepiteliales intestinales (IEL), células innatas linfoides (ILC), macrófagos y células dendríticas, se localiza justo arriba de la membrana basal entre las columnas de IEC; iii) las placas de Peyer (PP), nódulos linfáticos embebidos en la pared intestinal a lo largo del intestino delgado, separados por el compartimiento intraepitelial y la LP; iv) y finalmente por pequeños folículos linfoides, parecidos a PP microscópicas y que están distribuidos en las paredes del intestino.



**Figura 2. Barrera mucosa Intestinal.** Las células epiteliales intestinales (IEC) en conjunto de péptidos antimicrobianos (AMP), moco e inmunoglobulinas forman una barrera que provee una separación entre el contenido luminal y el interior del organismo. La mucosa intestinal incluye diversos tipos celulares que contribuyen en la inmunidad como macrófagos, células dendríticas (DC), células innatas linfoides (ILC), células M, células Goblet, células Paneth, células plasmáticas, linfocitos B, linfocitos T: intraepiteliales (IEL) y de lámina propia (LPL). Modificado de Faria et al., 2017.

Comúnmente las PP contienen células dendríticas, células B y células T organizadas en zonas foliculares y áreas interfoliculares respectivamente. Las PP consisten de un domo formado por células especializadas llamadas células M, las cuales muestrean el lumen y transportan antígenos (inclusive microorganismos) para ser presentados al sistema inmune [78]. Las células goblet también pueden muestrear el lumen y contribuir con la entrega de

antígenos a células dendríticas, esto sugiere que este fenómeno no es una función exclusiva de células M [79].

## 2.4 Linfocitos intraepiteliales de intestino

Los IEL son un subgrupo de células T diferenciadas situadas debajo de las uniones estrechas que unen las membranas plasmáticas de las IEC [74]. Los IEL están presentes en la proximidad inmediata de los antígenos del lumen intestinal, y no sólo sensan patógenos, sino que además contribuyen con la homeostasis local del tejido [80]. Los IEL desempeñan un papel clave en la protección contra antígenos foráneos, en el despegado y eliminación de vellosidades infectadas por virus y en el recambio de IEC [81]. Se estima que en humanos existen entre 10 y 20 IEL por cada 100 IEC, tan sólo en el intestino delgado [82]. Mientras que en ratones, los IEL están presentes con una densidad de 1 IEL por cada 10 IEC en el intestino delgado y 1 IEL por cada 40 IEC en el intestino grueso [83].

Los IEL constitutivamente expresan la glicoproteína CD103 (integrina  $\alpha E$ ) que junto a  $\beta 7$  forman la integrina  $\alpha E\beta 7$  [84, 85]. Hasta ahora el único ligando reportado para la integrina  $\alpha E\beta 7$  es la cadherina E, la cual se expresa en IEC y regula interacciones homofílicas dependientes de  $Ca^{2+}$  al lado de las uniones estrechas. Por otro lado, la molécula de adhesión a célula epitelial (EpCAM o CD326) también participa en la interacción física entre IEL y IEC [86]. Además, los IEL expresan constitutivamente cadherina E y ocludina, mientras que las células T en timo, bazo, hígado, MLN y PP no lo hacen [87].

El direccionamiento y entrada de IEL hacia el intestino se debe a la expresión de los receptores de quimiocinas CCR9 y CXCR3 y la expresión de las integrinas LFA1,  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 7$  [59, 88]. El ligando natural de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  es MadCAM-1 que se expresa en las células endoteliales de lámina propia a lo largo de todo el intestino. Mientras que, CCL25, el ligando de CCR9 solamente se expresa en células endoteliales y epiteliales del intestino delgado. Entonces, las células T que expresen ambos marcadores están condicionadas a residir sólo en el intestino delgado [89]. Interesantemente, una subpoblación de células dendríticas CCR7<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> metaboliza la vitamina A en ácido retinoico, que en conjunto de la activación de la célula T promueve y aumenta la expresión de  $\alpha 4\beta 7$  y CCR9 [90, 91].

Los IEL predominantemente son células T CD8<sup>+</sup> pero substancialmente diferentes de las células T periféricas, y a menudo expresan homodimeros CD8 $\alpha\alpha$ , particularmente en el intestino delgado [92]. Además, los IEL típicamente expresan marcadores asociados a actividad efectora como granzimas, ligando de Fas (CD95L) y RANTES (CCL5); y marcadores de activación como CD44, CD69 y CD11c, este último es reconocido como un marcador de activación en células T intestinales CD8<sup>+</sup> [61, 93, 94]. Sin embargo, no expresan CD25 o CD122, marcadores presentes en células periféricas T activadas [74]. Por otro lado, la población de IEL de humanos y ratones incluye una proporción significativa de linfocitos TCR $\gamma\delta$  [95]. Y no todos los IEL están distribuidos uniformemente a lo largo del intestino, lo que implica funciones específicas para cada población en áreas anatómicas particulares [61]. En

general, cabe destacar que los IEL son una población heteróloga con diversos fenotipos y funciones inmunológicas. Basándose en estas características, los IEL pueden dividirse en dos subgrupos: el tipo-a y el tipo-b [95, 96].

### 2.4.1 IEL tipo-a

Los IEL tipo-a expresan exclusivamente el  $\text{TCR}\alpha\beta$  y el co-receptor  $\text{CD8}\alpha\beta$  o  $\text{CD4}$  y están restringidas por el MHC clase I y MHC clase II respectivamente, esto significa que difícilmente reconocen auto antígenos [74]. Los IEL tipo-a se seleccionan en el timo de manera convencional y adquieren un fenotipo activo en respuesta a antígenos peptídicos para posteriormente migrar desde el GALT hacia el epitelio intestinal [59]. En consecuencia, estos linfocitos son escasos a edades tempranas, y después gradual y sostenidamente se acumulan con la edad en respuesta a antígenos exógenos; y llegan a abarcar el 70% de los IEL en la región distal del intestino delgado [97, 98]. Los IEL tipo-a son principalmente citotóxicos, y eliminan células mediante granzimas o ligando de Fas y además secretan citocinas tipo Th1 [96]. Estos linfocitos expresan varios marcadores celulares como CD2, CD5, CD28, LFA1, Thy-1 y antígeno-4 de linfocitos T citotóxicos [99-101]. También, muchos IEL tipo-a co-expresan  $\text{CD8}\alpha\alpha$  junto a  $\text{CD4}$  o  $\text{C8}\alpha\beta$ . La molécula  $\text{CD8}\alpha\alpha$  está formada por dos subunidades de  $\text{CD8}\alpha$  y posee la habilidad de reclutar componentes de la señalización TCR-CD3, como LCK ( $\text{p56}^{\text{LCK}}$ ) y LAT (del inglés “linker for activation of T cells”) [59]. Este homodímero no es un co-receptor del TCR, más bien, funciona como un represor de la activación de la célula T que puede secuestrar

componentes de la señalización fuera del complejo de activación TCR-CD3 [59, 61]. El complejo TCR-CD3 que expresan los IEL  $CD8\alpha\alpha^+$  está formado de heterodímeros  $CD3\zeta$ - $Fc\epsilon RI\gamma$  u homodímeros  $Fc\epsilon RI\gamma$ - $Fc\epsilon RI\gamma$ , en lugar del homodímero  $CD3\zeta$ - $CD3\zeta$ , que expresan la mayoría de las células  $TCR\alpha\beta^+$  [102]. Actualmente, el único ligando reportado para la molécula  $CD8\alpha\alpha^+$  es el antígeno de leucemia en timo (TLA), que es una molécula no clásica de MHC clase I, y se expresa abundantemente en IEC del intestino delgado del ratón [59]. Parece ser que en un ambiente rico en antígenos como lo es la mucosa intestinal, el TLA sirve para prevenir la proliferación de IEL cuando reciben un bajo estímulo antigénico [95]. Las resoluciones cristalográficas muestran que en contraste a las moléculas de MHC clase I, el surco putativo de unión a péptido presente en TLA se encuentra cerrado [103]. Consistentemente con este hallazgo la expresión de TLA en la superficie celular es independiente del transportador de péptido TAP, pero dependiente de la asociación no covalente con  $\beta_2$ -microglobulina [61].

En general los IEL tipo-a pertenecen a la inmunidad adaptativa y participan en la defensa contra patógenos, muy probablemente contra aquellos transmitidos oralmente [61].

#### 2.4.2 IEL tipo-b

En contraste, los IEL tipo-b expresan el  $TCR\alpha\beta$  o el  $TCR\gamma\delta$  con o sin  $CD8\alpha\alpha$  y no expresan los co-receptores  $CD8\alpha\beta$  o  $CD4$ . Primero, los linfocitos triple-positivo que expresan  $CD8\alpha\alpha$ ,  $CD4$  y  $CD8\alpha\beta$ , se diferencian en dobles-negativos [(DN)  $CD4^- CD8\alpha\beta^-$ ]  $TCR\alpha\beta^+$  o  $TCR\gamma\delta^+$  como precursores de los IEL

tipo-b [74]. Posteriormente, adquieren un fenotipo parcialmente activo en respuesta a auto-antígenos (“selección agonista”) y migran hacia el intestino donde el entorno rico en interleucina-15 (IL-15) induce la expresión de más CD8 $\alpha\alpha$  [104]. Las células T dobles-negativas, que son raras en circulación sistémica, pueden abarcar >10% de los IEL en el intestino del ratón [96].

Aunque se piensa que la selección negativa es uno de los mayores mecanismos en eliminar células T auto-reactivas e inducir tolerancia central, existen evidencias que muestran que no todos los TCRs con elevada auto-afinidad son eliminados [102]. Este proceso de selección alternativa se define como selección agonista y preserva células T auto-reactivas que maduran en linajes no convencionales [104]. La selección agonista refleja el hecho de que algunos tipos de células T requieren interacciones relativamente fuertes con auto-antígenos para la selección positiva y diferenciación en linfocitos T especializados [102]. Se piensa que diversos subgrupos de células T se desarrollan a través de esta vía alternativa, como: las células T reguladoras (Treg), las células T NK, las células T DN TCR $\alpha\beta$  y algunas poblaciones de IEL que expresan CD8 $\alpha\alpha$  [104]. Estos datos muestran que la visión simplista de la selección en timo necesita ser revisada para incluir procesos de selección alternativos que preservan células auto-reactivas [105].

Generalmente, los IEL tipo-b no expresan los marcadores de superficie CD2, CD5, CD28, LFA1 o Thy-1 [95]. Por el contrario, una característica particular de estos IEL es la expresión de receptores de células NK (NKR), denominándolos IEL T NK [106]. En el ratón, la expresión de NKR está

restringida a los IEL tipo-b, pero en los humanos el tipo-a también expresa NKRs [95]. La gran mayoría de NKRs que se encuentran en IEL son CD94/NKG2 (NKG2A, NKG2C) y NKG2D [95]. Además, como se mencionó más arriba los IEL  $CD8\alpha\alpha^+$ , preferencialmente usan la cadena  $Fc\epsilon RI\gamma$ , una subunidad del complejo multimerico  $Fc\gamma RIII A$  (CD16) expresado por células NK, como parte del complejo TCR-CD3 [107]. De manera similar al tipo-a, los IEL tipo-b expresan altos niveles de moléculas efectoras como granzimas y ligando de FAS [96]. Los IEL  $CD8\alpha\alpha^+ TCR\alpha\beta^+$  básicamente reconocen antígenos microbianos y a diferencia de los tipo-a reconocen auto antígenos, principalmente inducidos por la presencia de bacterias comensales [108]. Existe poca evidencia de memoria inmunológica en los IEL tipo-b, sin embargo se sugiere que pueden ser auto-reactivos y presentar auto-inmunidad. Debido a estas características, a los IEL tipo-b se relacionan con las respuestas del sistema inmune innato y con la homeostasis del tejido [61].

## 2.5 Justificación

Los rotavirus son el principal agente etiológico de gastroenteritis aguda en infantes humanos y representan un serio problema de salud pública. Previamente, se reportó en ratones que la inoculación i.n. de la proteína recombinante VP6 de rotavirus en conjunto de algunos adyuvantes tuvo eficacia en contra de este agente infeccioso. Este mismo efecto también se encontró con la inoculación i.n. de VP6<sub>289-302</sub> en conjunto de LT(R192G) y de VP6<sub>287-304</sub> en conjunto de CT. Estos péptidos sintéticos contienen un epítipo putativo de

células T cooperadoras reconocido en el contexto de la molécula de MHC clase II I E<sup>d</sup>; por lo que este modelo ofrece una excelente oportunidad para estudiar los mecanismos efectores de una respuesta de memoria de células T cooperadoras monoclonal contra rotavirus a nivel intestinal. Sin embargo, estos adyuvantes son caros y difíciles de importar por restricciones de bioseguridad. Por lo tanto, nos propusimos evaluar adyuvantes más accesibles, como es el caso de los agonistas de TLRs, para inducir protección contra la infección y de esta manera poder analizar los mecanismos efectores a nivel intestinal en este modelo.

## **2.6 Pregunta de investigación**

¿La inoculación i.n. del péptido sintético VP6<sub>287-304</sub> en conjunto de un agonista de TLR3, TLR4 o TLR9 como adyuvante puede conferir protección y cuáles son los probables mecanismos responsables de ello?

## **2.7 Hipótesis**

La inoculación i.n. del péptido sintético VP6<sub>287-304</sub> en conjunto de un agonista de TLR3, TLR4 o TLR9 como adyuvante, inducirá una reducción de la excreción viral posterior al reto con rotavirus y esta reducción correlacionará con un aumento en la población de IEL, así como en la producción de IFN- $\lambda$  por estos linfocitos y por IEC.

## **2.8 Objetivos**

### **2.8.1 Objetivo general**

Evaluar en un modelo murino de inoculación i.n. la capacidad protectora contra la infección por rotavirus del péptido sintético VP6<sub>287-304</sub> en conjunto de los adyuvantes poly IC, LPS o CpG ODN1826 y correlacionar la protección con la respuesta de las IEC y los IEL.

### **2.8.2 Objetivos particulares**

- Reproducir el modelo de protección contra la infección por rotavirus en ratones vacunados de manera i.n. con el péptido sintético VP6<sub>287-304</sub> en conjunto del adyuvante CT.
- Evaluar si los agonistas de TLRs: poly IC, LPS o CpG ODN1826 son capaces de sustituir a la CT en la inducción de protección contra la infección por rotavirus cuando se administran de manera i.n. en conjunto del péptido sintético VP6<sub>287-304</sub>.
- Determinar la cinética (porcentaje y número absoluto) de células T CD4<sup>+</sup> en el compartimiento intestinal intraepitelial en ratones inoculados de manera i.n. con algunos de los agonistas de TLRs y el péptido sintético VP6<sub>287-304</sub>.
- Determinar la cinética de la expresión del mRNA para IFN-λ 2/3 en muestras enriquecidas con IEL y IEC.

## Capítulo 3. Metodología

### 3.1 Animales

Se emplearon ratones hembra BALB/c (H-2<sup>d</sup>) de 4 a 8 semanas de edad, libres de patógenos. Los animales se alojaron en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UAEM en contenedores de policarbonato (cuatro por caja) con un lecho de aserrín estéril, a temperatura ambiente (20-27°C), bajo condiciones estándar de luz (12h luz-oscuridad) y con agua y alimento *ad libitum*.

### 3.2 Medios y reactivos

Solución **Hank's** sin calcio y magnesio (5.33 mM KCl, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 138 mM NaCl, 4.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.5mM Glucosa). Solución **CMF** (solución Hank's libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, 10 mM HEPES, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> y 2% FBS). Solución **TNC** (10 mM Tris, 100 mM NaCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7.4). Solución **PBS** (137 mMNaCl, 2.7 mMKCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3). Solución **RPMI**<sup>+</sup> (medio RPMI-1640 suplementado con 2 mM L-glumatina, 10 mM HEPES, 0.05 mM β-mercaptoetanol, 1% penicilina/estreptomicina y 10 % FBS). Solución **RBC** de lisis (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mMKHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA).

### 3.3 Virus

Se utilizó la cepa silvestre de rotavirus murino EDIM (del inglés: “epizootic diarrhea of infant mice”). El virus se propagó al infectar el intestino de ratones neonatos de 3-5 días con 1 x 10<sup>4</sup> unidades formadoras de focos (uff) (100 veces

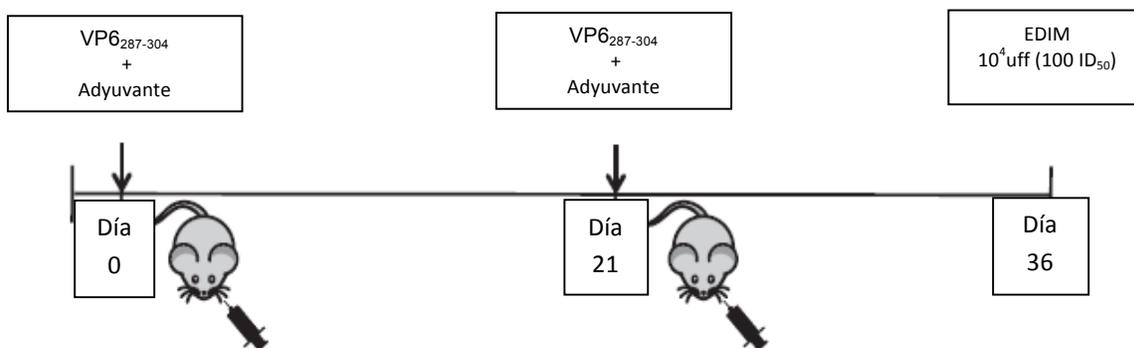
ID<sub>50</sub>) y 72 h después los intestinos se recolectaron, homogenizaron y almacenaron en TNC a - 80°C hasta su uso como se describió en [109].

### 3.4 Péptido sintético

Se empleó el péptido sintético de 18 aminoácidos correspondiente a la secuencia NH<sub>2</sub>-TIRLSFQLMRPPNMTPAV-COOH de la región 287-304 de la proteína estructural VP6 de rotavirus murino EDIM. Este péptido contiene la secuencia de catorce aminoácidos previamente reportada como un epítipo putativo de células T CD4<sup>+</sup> en el contexto de la molécula de MHC clase II IE<sup>d</sup>. El péptido VP6<sub>287-304</sub> posee un peso molecular de 2,072.5 g/mol, un punto isoeléctrico de 12.1 y una carga neta de +2 a pH 7.

### 3.5 Inmunización de los animales

Bajo sedación con pentobarbital [150 µL de pentobarbital intraperitoneal (1:9 v/v en PBS) por 20 g de peso del animal], se administró a los ratones de manera i.n. dos dosis separadas por 21 días del péptido sintético VP6<sub>287-304</sub> en conjunto de uno de los adyuvantes: toxina de Cólera (CT), ácido poliriboinosínico poliribocitidílico (poly IC), lipopolisacárido (LPS) u oligodeoxinucleotidos CpG sin metilar (CpG ODN1826) (**Figura 3**). Cada dosis consistió de 50 µg de péptido y 10 µg de un adyuvante: CT, poly IC, LPS o CpG ODN1826, resuspendidos en 30 µL PBS. Al grupo de animales control se les administró únicamente el adyuvante o PBS.



**Figura 3. Esquema de inoculación intranasal y reto con rotavirus.** Los ratones se inocularon dos veces separadas por 21 días con 50  $\mu\text{g}$  de VP6<sub>287-304</sub> más un adyuvante (10  $\mu\text{g}$  de CT, poly IC, LPS o CpG ODN1826) y dos semanas después de la última inoculación se retaron oralmente con rotavirus murino EDIM.

### 3.6 Infección de los animales

Quince días después de la segunda inmunización los ratones se retaron oralmente con el virus EDIM. Primero, el ácido gástrico se neutralizó con la administración de 100  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de sodio al 1.3% (w/v) mediante intubación esofágica. Después de 5 min, los ratones se inocularon con 10<sup>4</sup> uff (100 ID<sub>50</sub>) del rotavirus EDIM suspendidos en 100  $\mu\text{L}$  de DMEM libre de suero con la ayuda de una cánula gastroesofágica.

### 3.7 Detección del antígeno viral y de la IgA intestinal

Se recolectaron dos heces por ratón cada 24 h durante los 7 días posteriores al reto con EDIM y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Las heces se disgregaron en solución diluyente (TNC, 5% FBS, 0.05% Tween-20, 10 mM NaN<sub>3</sub>) a una concentración de 5% (w/v) y la cantidad relativa de virus y de IgA

intestinal en los sobrenadantes se determinó por medio de un ensayo ELISA de captura como se describió en [110].

### **3.8 Determinación de la reducción de la excreción viral**

El porcentaje de la reducción de antígeno viral en heces se calculó, al comparar la media del antígeno viral por ratón por día en los grupos inmunizados contra los grupos sin inmunizar.

### **3.9 Células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón y su estimulación con agonistas de TLRs**

Para derivar células dendríticas a partir de médula ósea se pasó 1 mL de RPMI<sup>+</sup> a través de la cavidad medular de la tibia y el fémur de ratón y se recuperó la médula ósea en placa de cultivo celular. La médula ósea se re-suspendió y se centrifugó a  $2 \times 10^3$  r.p.m. por 5 min a 4°C. Después, el botón celular se incubó por 3 min en 3 mL de solución RBC de lisis para eliminar los eritrocitos presentes. Posteriormente, se sembraron  $10 \times 10^6$  de células en RPMI<sup>+</sup> suplementado con 10 µg/mL del factor estimulante GM-CSF por 8 días a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Los días 3, 5 y 7 se remplazaron 10 mL del medio con nuevo RPMI<sup>+</sup> suplementado con 10 µg/mL de GM-CSF. Al día 8 las células dendríticas derivadas se recuperaron mediante pipeteo al agregar 1 mL de PBS frío suplementado con EDTA 0.5 mM. Finalmente, se cultivaron  $2 \times 10^6$  de estas células por pozo en presencia de 10 µg/mL y 1 µg/mL de poly IC o CpG ODN1826 por 18 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.10 Aislamiento de IEC y IEL**

Los IEL se aislaron de acuerdo al protocolo previamente descrito en nuestro laboratorio, acoplado al aislamiento simultáneo de IEC. El intestino (1cm distal del píloro y 1 cm proximal a la válvula ileocecal) se mantuvo a 4°C en solución CMF para remover la grasa, tejido conectivo y PP. Posteriormente, el intestino se cortó longitudinalmente y después transversalmente en piezas de 5-10 mm y se lavó tres veces con solución CMF para remover las heces restantes. Las IEC y los IEL se disociaron del tejido intestinal mediante la agitación constante (280 r.p.m.) de las muestras por 40 min a 37°C en solución CMF suplementada con DTT 2 mM y EDTA 5 mM. El sobrenadante se filtró a través de un colador celular de 70  $\mu\text{m}$  y el botón celular se re-suspendió en percoll isotónico al 44% (100% percoll = 9 partes percoll [1.130 g/ml] + 1 parte PBS 10x). Las células se centrifugaron en un gradiente de percoll 20/44/67 a 400 xg durante 20 min a temperatura ambiente. Las IEC se recuperaron de la interface 20/44, mientras que, los IEL se recuperaron de la interface 44/67. Las células viables se contaron mediante un ensayo de exclusión por azul de tripano. La suspensión celular 44/67 se designó como población linfóide y se usó en los ensayos posteriores.

### **3.11 Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA**

Las IEC y los IEL se recolectaron de las interfaces de percoll 20/44 y 44/67 respectivamente, se re-suspendieron en solución Hank's y se centrifugaron por 5 min a  $2 \times 10^3$  r.p.m. El botón celular ( $10 \times 10^6$  de células) se re-

suspendió completamente en 1 mL de TRizol® (Invitrogen) y las células se lisaron por 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó en hielo por 3 min. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 15 min a  $12 \times 10^3$  r.p.m. y se recuperó la fase superior acuosa incolora. Se añadieron 500 µl de isopropanol para precipitar el RNA, posteriormente la pastilla se lavó con etanol al 75 % (v/v) y finalmente se re-suspendió en agua libre de nucleasas y se solubilizó por 5 min a 65°C. El RNA se cuantificó con la ayuda de un BioDrop® y posteriormente se verificó su integridad al visualizar en un transiluminador UV las subunidades 28S, 18s y 5s en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Para la síntesis de cDNA se utilizaron 2 µg de RNA para cada muestra y se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante ThermoFisher®.

### **3.12 Análisis de la expresión del mRNA de IFN-λ 2/3 y β-actina**

La expresión de mRNA de IFN-λ 2/3 y β-actina se evaluó mediante PCR punto final y se utilizó la DNA *Taq* polimerasa. Para IFN-λ 2/3 se emplearon los oligos AGCTGCAGGCCTTCAAAAAG y TGGGAGTGAATGTGGCTCAG, y ATGAGGTAGTCTGTCAGGT y ATGGATGACGATATCGCT para β-actina, sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 20 µL que contenía: 1 µL de cDNA, 1 µL de oligo sentido, 1 µL de oligo anti sentido, 2 µL dNTPs (2mM), 1.5 µL de  $Mg^{2+}$ , 0.5 µL de enzima *Taq* polimerasa, 2 µL de buffer 10X con  $(NH_4)_2 SO_4$  de ThermoFisher®. Las muestras se incubaron en un termociclador por 2 min a 92°C, seguido de 30

ciclos de: 1 min a 92°C, 1 min a 62°C, y 1 min a 72°C, y por último una extensión por 10 min a 72°C. Finalmente, los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador UV.

### **3.13 Anticuerpos y citofluorometría de flujo**

Se usaron los siguientes anticuerpos conjugados con fluoroforos con reactividad a antígenos de ratón: anti-CD103-PE (2E7) y anti-CD4-FITC (GK1.5). Las células se analizaron mediante la adquisición de  $1 \times 10^4$  eventos en un citómetro FACS Aria II (BD Biosciences) y los datos se compilaron con el uso del software FlowJo (TreeStar). El número absoluto de células se calculó con la frecuencia que se obtuvo mediante citofluorometría y el número total de células que se contó en hematocitometro.

### **3. 14 Análisis estadístico**

Todas las pruebas se calcularon mediante el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) con ayuda del software Prism 5.0 (GraphPad Software Inc).

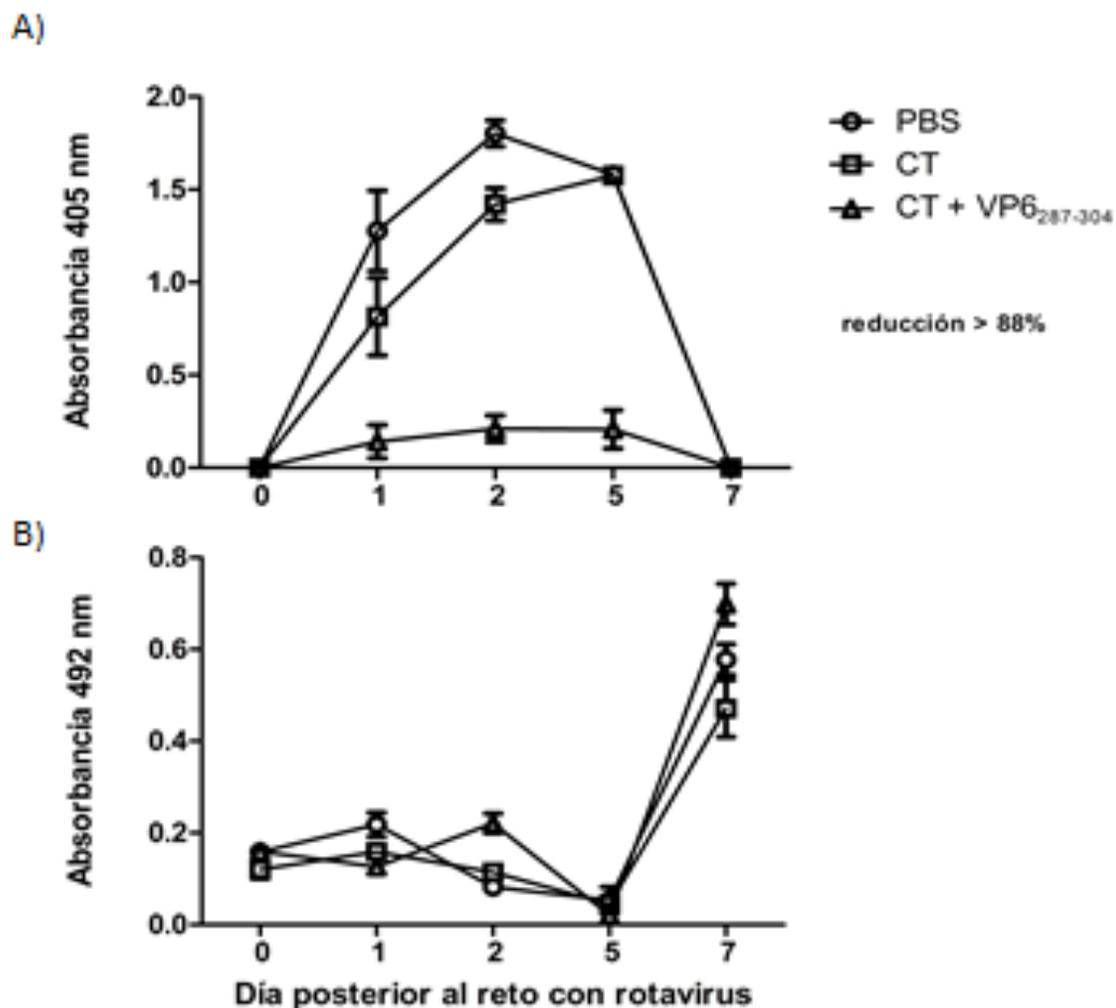
## Capítulo 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Inducción de protección en ratones contra la infección por rotavirus con la inoculación i.n. de VP6<sub>287-304</sub> y CT

Anteriormente, se demostró en ratones que la inoculación i.n. del péptido sintético VP6<sub>289-302</sub>, un epítipo putativo de células T cooperadoras presentado por la molécula del MHC clase II IE<sup>d</sup>, en conjunto de LT(R192G) como adyuvante, redujo la excreción viral posterior al reto con rotavirus [11]. Posteriormente, en nuestro laboratorio Hernández, A. et al., encontraron que la LT(R192G) puede ser sustituida por CT con resultados similares. Esto probablemente se basó en que ambas enterotoxinas son homólogas (>80% de identidad) y activan la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B; como consecuencia, aumenta la expresión de moléculas co-estimuladoras y la secreción de citocinas, necesarias para la activación de células T [111, 112].

En este trabajo se comprobó el resultado de Hernández, A. et al., para ello, los ratones se inocularon de manera i.n. con VP6<sub>287-304</sub> y CT, dos veces separadas por 21 días, los grupos control se inocularon sólo con CT o PBS. El péptido sintético VP6<sub>287-304</sub> contiene la secuencia 289-302 y también es reconocido por las células T cooperadoras (dato no mostrado). Dos semanas después de la última inoculación, los ratones se retaron oralmente con el rotavirus murino EDIM y se determinó la carga viral en las heces hasta el día 7 post-infección. Se encontró, que VP6<sub>287-304</sub> y CT redujeron hasta un 88 % la excreción viral, mientras que, CT sólo redujo un 19.5 % en comparación de PBS

como control (**Figura 4A**). Además, en la reducción de la excreción viral no participó la IgA intestinal anti-rotavirus, ya que los niveles encontrados en todos los grupos fueron similares (**Figura 4B**). Este resultado, también mostró que los ratones no estuvieron previamente expuestos a rotavirus (**Figura 4B**).



**Figura 4. Efecto de la inoculación i.n. con VP6<sub>287-304</sub> y CT en la excreción viral y en la producción de IgA intestinal posterior al reto con rotavirus.** Los ratones se inocularon dos veces separadas por 21 días y dos semanas después de la última inoculación se retaron oralmente con el rotavirus murino EDIM. **A)** El antígeno viral y **B)** la IgA intestinal se cuantificaron en las heces durante 0, 1, 2, 5, y 7 días subsecuentes al reto mediante un ELISA de captura. Las barras representan la SD de la absorbancia promedio dentro del grupo. La figura es representativa de un experimento piloto, n= 3 ratones por grupo.

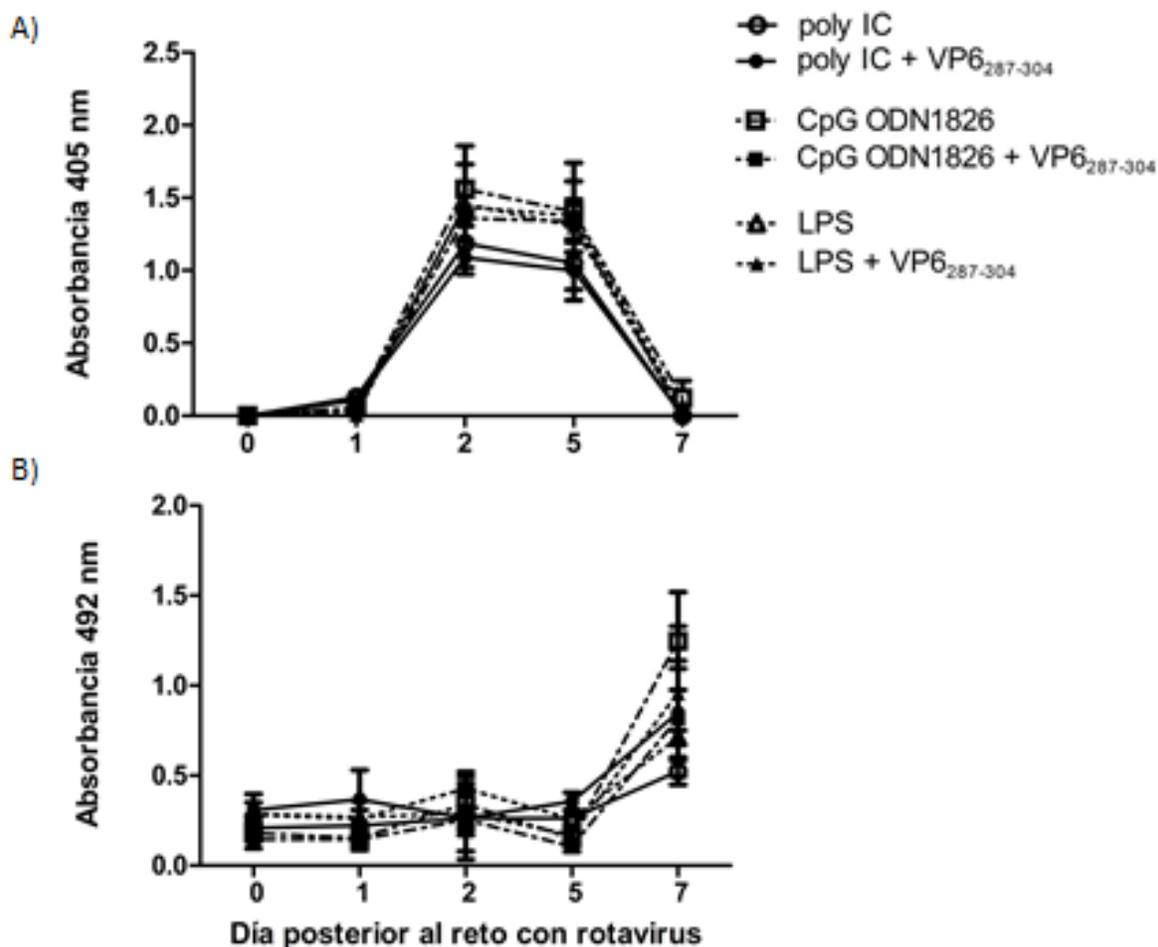
En conjunto, estos resultados mostraron una potente respuesta de memoria antiviral a nivel intestinal, que muy probablemente estuvo mediada por células T cooperadoras de memoria péptido específicas, ya que el péptido sintético VP6<sub>287-304</sub> contiene un epítipo putativo de células T CD4<sup>+</sup>.

Aunque este modelo experimental resulta sumamente atractivo para analizar los mecanismos celulares responsables de la inmunidad a nivel intestinal, tiene el inconveniente de que tanto LT(R192G) como CT son adyuvantes poco accesibles. Además, de acarrear posibles efectos secundarios negativos en humanos como la parálisis facial periférica entre otros, lo que impide su uso a futuro[113-117]. Por lo tanto, es importante explorar otros adyuvantes más accesibles y con posibilidades de uso en humanos.

#### **4.2 Efecto en ratones de la inoculación i.n. de VP6<sub>287-304</sub> y los agonistas de TLR3, TLR4 y TLR9**

Con la finalidad de sustituir CT como adyuvante, se evaluó la capacidad de algunos agonistas de TLRs para inducir una respuesta péptido específica a nivel intestinal. Los ratones se inocularon de manera i.n. con el péptido sintético VP6<sub>287-304</sub> y uno de los siguientes adyuvantes: poly IC (TLR3), LPS (TLR4) o CpG ODN1826 (TLR9). Se seleccionaron estos agonistas de TLRs por su fácil acceso comercial, así como su probada efectividad en este y otros modelos [6, 118]. Como control, los ratones se inocularon de manera i.n. solamente con el adyuvante. Cuando los ratones se retaron con el rotavirus murino EDIM, ninguno de los grupos experimentales mostró una reducción de la excreción viral en

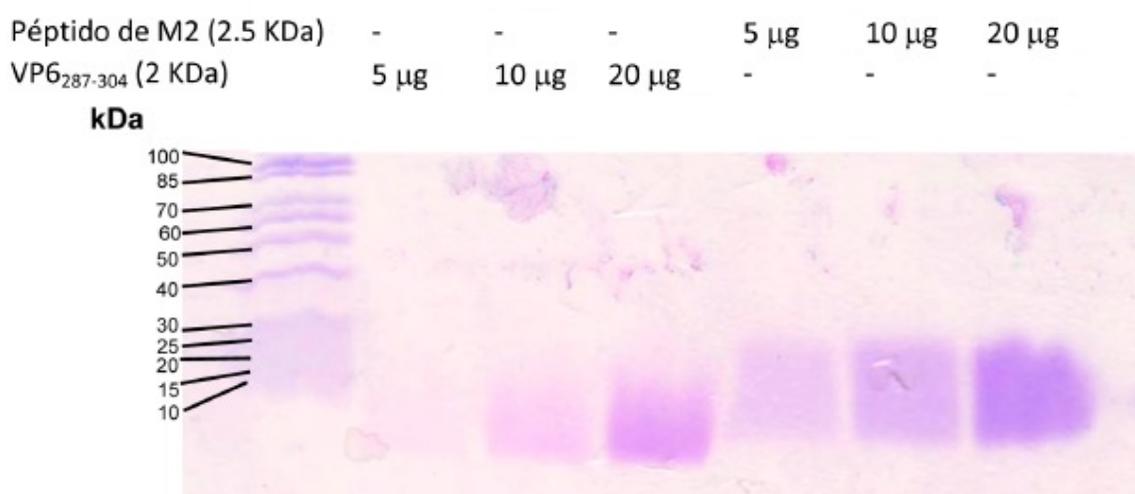
comparación con su control (**Figura 5A**). Tampoco se encontraron diferencias en la IgA intestinal específica para rotavirus (**Figura 5B**).



**Figura 5. Efecto de la inoculación i.n. con VP6<sub>287-304</sub> y los agonistas de TLR3, TLR4 y TLR9 en la excreción viral y en la producción de IgA intestinal posterior al reto con rotavirus.** Los ratones se inocularon dos veces separadas por 21 días con VP6<sub>287-304</sub> en conjunto de un adyuvante: poly IC, LPS o CpG ODN1826 y dos semanas después de la última inoculación se retaron oralmente con el rotavirus murino EDIM. El antígeno viral en heces se cuantificó durante 0, 1, 2, 5, y 7 días subsecuentes al reto mediante un ELISA de captura. Las barras representan la SD de la absorbancia promedio dentro del grupo. La figura es representativa de tres experimentos independientes, n= 4 ratones por grupo.

Para eliminar la posibilidad de que en estos experimentos el péptido que se inoculó estuviera degradado, la integridad de éste se evaluó mediante un gel de poliacrilamida al 20 % en medio desnaturizante y teñido con azul de

coomasie. Como control, se empleó un péptido de 23 aminoácidos de la proteína M2 del virus influenza. Se encontró que el péptido de la proteína M2 tiene un peso molecular de aproximadamente 2.5 kDa, mientras que, el péptido VP6<sub>287-304</sub> mostró señal en una sola banda de aproximadamente 2 kDa (**Figura 6**). Este resultado indicó claramente que el péptido sintético VP6<sub>287-304</sub> no estuvo degradado antes de ser inoculado.



**Figura 6. Integridad del péptido sintético VP6<sub>287-304</sub> (2 KDa).** Electroforesis en gel de poliacrilamida (20%) con dodecilsulfato sódico teñido con azul de coomasie.

Además, se demostró que los agonistas de TLR empleados no estuvieron degradados antes de ser inoculados. Para ello, se probó *in vitro* la capacidad de poly IC y CpG ODN1826 para inducir la expresión del mRNA de IFN- $\lambda$  2/3 en células dendríticas de ratón [119]. Solamente se examinaron los agonistas derivados de ácidos nucleicos, ya que estos son más susceptibles a degradación. Primero, se derivaron células dendríticas a partir de células de médula ósea de ratón (BM-DCs) por 8 días en presencia del factor estimulante

GM-CSF. Al término de este tiempo, las BM-DCs se recolectaron y se sembraron en cajas de 24 pozos con  $2 \times 10^6$  de células por pozo. Después, las BM-DCs se estimularon por 18 h con dos concentraciones diferentes de poly IC o CpG ODN1826. Como control negativo, se incluyeron BM-DCs sin estímulo y como control positivo se usaron células de bazo de ratón con el estímulo de Con-A por 72 h (como estimulador inespecífico de células T). Las células se recolectaron, se aisló el RNA total y se sometió a un ensayo de PCR con oligos específicos para el mRNA de IFN- $\lambda$  2/3. Se encontró, que tanto poly IC como CpG ODN1826 provocaron un claro aumento en BM-DCs del mRNA de IFN- $\lambda$  2/3 a las concentraciones empleadas, esto indicó que éstos agonistas de TLRs no estuvieron degradados antes de la inoculación i.n. (**Figura 7**).

|                           |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------|---|---|---|---|---|---|
| BM-DCs                    | + | + | + | + | - | + |
| Bazo Con-A (5 $\mu$ g/mL) | - | - | - | - | + | - |
| Poly IC (10 $\mu$ g/mL)   | + | - | - | - | - | - |
| CpG (10 $\mu$ g/mL)       | - | - | + | - | - | - |
| Poly IC (1 $\mu$ g/mL)    | - | + | - | - | - | - |
| CpG (1 $\mu$ g/mL)        | - | - | - | + | - | - |



**Figura 7. Efecto sobre células dendríticas derivadas de médula ósea en respuesta a ligandos de TLR.** Las BM-DCs con ocho días de diferenciación se trataron por 18 h con los agonistas de TLR3 y TLR9, y se determinó la expresión del mRNA de IFN- $\lambda$  2/3 mediante PCR punto final.

Con los experimentos anteriores se descartó que el péptido o los agonistas de los TLRs *per se* fueran la probable causa de los resultados

negativos. Sin embargo, por lo menos en el caso de los adyuvantes con estructura de ácidos nucleicos, existe la posibilidad de que fueran degradados en la mucosa nasal antes de cumplir su función adyuvante. Algunos autores han sugerido para la inoculación i.n. el uso de poly IC poly lisina carboximetil celulosa (poly ICLC) que es de 5 a 10 veces más resistente que poly IC a la hidrólisis por RNAasas, sin afectar su capacidad para unirse y estimular TLR3 [120].

Es importante que en futuros experimentos se intentase sustituir la CT como adyuvante, por ejemplo, con un agonista de TLR modificado y/o algún sistema de entrega eficiente de materiales de vacunación para incrementar su potencia como adyuvante de mucosa.

#### **4.3 Efecto en IEC y IEL y en la población de células T CD4<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> en respuesta a rotavirus**

A pesar de que los agonistas de TLRs que se emplearon como adyuvantes no lograron inducir protección contra la infección por rotavirus en ratones inoculados de manera i.n. con VP6<sub>287-304</sub>, se decidió continuar con ensayos que establecieron condiciones experimentales para analizar la respuesta de los IEL y las IEC en trabajos futuros.

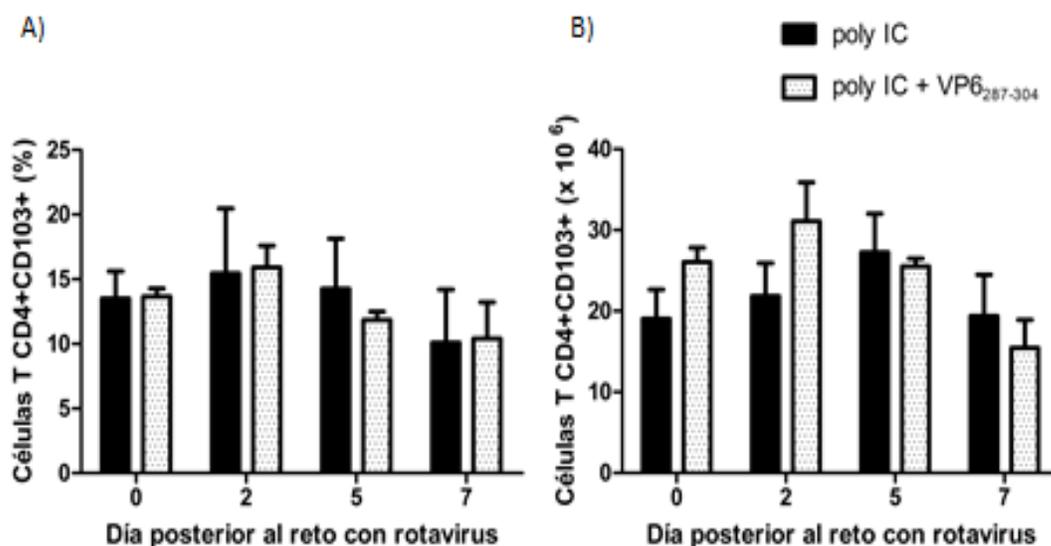
Como se mencionó anteriormente, en la protección que se observó en los ratones vacunados con el péptido VP6<sub>287-304</sub> y CT no participó IgA, y probablemente se debió a células T CD4<sup>+</sup> epítipo-específicas que quizá estuvieron presentes en el compartimiento intraepitelial, un sitio efector del intestino delgado. Por ello, se evaluó si en los ratones inoculados de manera i.n.

con VP6<sub>287-304</sub> y poly IC existió un aumento de la población de células T CD4<sup>+</sup> en los IEL. Como control se utilizó un grupo de ratones inoculados solamente con poly IC. Los días 0, 2, 5 y 7 post-infección con el rotavirus murino EDIM, se obtuvieron muestras enriquecidas con IEL y a través de citometría de flujo se analizó la expresión de CD4 y CD103 (molécula de adhesión característica de la población intraepitelial).

Los resultados mostraron la presencia de células T CD4<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> en porcentajes que abarcaron desde el 5-15% tanto en el grupo control como en el grupo inoculado de manera i.n. con VP6<sub>287-304</sub> y poly IC (**Figura 8**). Además, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, ni entre los días posteriores al reto con rotavirus (**Figura 8A**). Tampoco hubo diferencias significativas entre estos grupos o entre los días posteriores al reto con rotavirus en el número absoluto de las células T CD4<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> (**Figura 8B**). Estos porcentajes se situaron dentro de los reportados previamente y se reconoce que su varianza depende de la edad y cepa de los animales [83, 98, 121, 122].

Por otra parte, reportes previos sugirieron que la producción de IFN- $\lambda$  2/3 por parte de las IEC intestinales correlacionó con la eliminación de la infección por rotavirus [15, 17]. Además, otro estudio demostró que con el estímulo con anti-CD3 los IEL también produjeron IFN- $\lambda$  2/3 [123]. Por ello, se determinó en la cinética de infección con rotavirus la expresión del mRNA de IFN- $\lambda$  2/3 en muestras enriquecidas con IEC o IEL, como expresión constitutiva se amplificó el mRNA de  $\beta$ -actina.

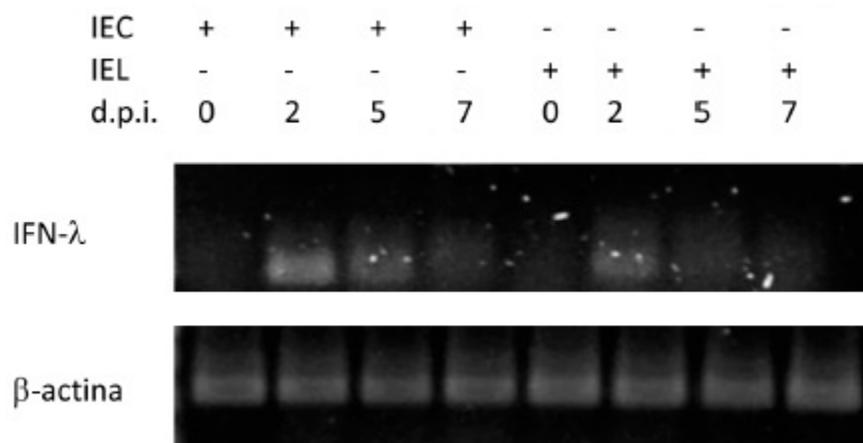
Los resultados mostraron, que tanto las muestras enriquecidas con IEC o con IEL del segundo día post-infección expresaron el mRNA de IFN- $\lambda$  2/3 (**Figura 9**). La producción de IFN- $\lambda$  2/3 en las IEC comprobó los hallazgos previos, sin embargo, la producción de esta citocina en los IEL como consecuencia de la infección con rotavirus no se había reportado.



**Figura 8. Células T CD4<sup>+</sup> en la población intraepitelial de ratones inoculados de manera i.n. con VP6<sub>287-304</sub> y poly IC.** Los ratones se inocularon dos veces separadas por 21 días con VP6<sub>287-304</sub> y poly IC y dos semanas después de la última inoculación se retaron oralmente con el rotavirus murino EDIM. Se aislaron muestras enriquecidas con IEL los días 0, 2, 5, y 7 subsecuentes al reto y se analizó: **A)** frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> en la población de IEL y **B)** número absoluto de células T CD4<sup>+</sup> en la población de IEL. Las barras representan la SD dentro del grupo. La figura es representativa de tres experimentos independientes.

Finalmente, aunque no se logró el objetivo de determinar la función de los IEL y las IEC en ratones vacunados de manera i.n. con VP6<sub>287-304</sub> y un adyuvante agonista de TLR, sí se establecieron las condiciones experimentales

para que en futuros trabajos se establezca el papel de estas células en este modelo.



**Figura 9. Expresión de IFN- $\lambda$  2/3 en muestras enriquecidas con IEC o IEL durante la cinética de infección con rotavirus.** Amplificación del mRNA de IFN- $\lambda$  2/3 y del mRNA constitutivo de  $\beta$ -actina mediante PCR punto final durante los días 0, 2, 5 y 7 posteriores a la infección (d.p.i.) con rotavirus.

## Capítulo 6. Conclusiones

1. La inoculación i.n. del péptido sintético VP6<sub>287-304</sub> en conjunto de uno de los siguientes adyuvantes: poly IC, LPS o CpG ODN1826, no reduce la excreción viral en ratones posterior al reto con rotavirus homólogo.
2. Durante la infección con rotavirus homólogo en ratones no se observa un cambio significativo en la frecuencia o en el número absoluto de la población CD4<sup>+</sup> de IEL.
3. Los IEL de ratón expresan IFN- $\lambda$  2/3 en respuesta a la infección por rotavirus homólogo. La expresión de interferón tipo III en IEL durante la infección con rotavirus no se había reportado.

## Bibliografía

1. Rappuoli, R., et al., *Vaccines for the twenty-first century society*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(12): p. 865-72.
2. Kim, S.H. and Y.S. Jang, *The development of mucosal vaccines for both mucosal and systemic immune induction and the roles played by adjuvants*. Clin Exp Vaccine Res, 2017. **6**(1): p. 15-21.
3. Gutjahr, A., et al., *Triggering Intracellular Receptors for Vaccine Adjuvantation*. Trends Immunol, 2016. **37**(9): p. 573-87.
4. Choi, A.H., et al., *Antibody-independent protection against rotavirus infection of mice stimulated by intranasal immunization with chimeric VP4 or VP6 protein*. J Virol, 1999. **73**(9): p. 7574-81.
5. Choi, A.H., et al., *Intranasal or oral immunization of inbred and outbred mice with murine or human rotavirus VP6 proteins protects against viral shedding after challenge with murine rotaviruses*. Vaccine, 2002. **20**(27-28): p. 3310-21.
6. Choi, A.H., et al., *The level of protection against rotavirus shedding in mice following immunization with a chimeric VP6 protein is dependent on the route and the coadministered adjuvant*. Vaccine, 2002. **20**(13-14): p. 1733-40.
7. McNeal, M.M., et al., *CD4 T cells are the only lymphocytes needed to protect mice against rotavirus shedding after intranasal immunization with a chimeric VP6 protein and the adjuvant LT(R192G)*. J Virol, 2002. **76**(2): p. 560-8.
8. McNeal, M.M., et al., *Protection against rotavirus shedding after intranasal immunization of mice with a chimeric VP6 protein does not require intestinal IgA*. Virology, 2006. **346**(2): p. 338-47.
9. McNeal, M.M., et al., *IFN-gamma is the only anti-rotavirus cytokine found after in vitro stimulation of memory CD4+ T cells from mice immunized with a chimeric VP6 protein*. Viral Immunol, 2007. **20**(4): p. 571-84.
10. Smiley, K.L., et al., *Association of gamma interferon and interleukin-17 production in intestinal CD4+ T cells with protection against rotavirus shedding in mice intranasally immunized with VP6 and the adjuvant LT(R192G)*. J Virol, 2007. **81**(8): p. 3740-8.

11. Choi, A.H., et al., *Functional mapping of protective domains and epitopes in the rotavirus VP6 protein*. J Virol, 2000. **74**(24): p. 11574-80.
12. Banos, D.M., et al., *Identification of a T-helper cell epitope on the rotavirus VP6 protein*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 419-26.
13. Franco, M.A. and H.B. Greenberg, *Immunity to rotavirus in T cell deficient mice*. Virology, 1997. **238**(2): p. 169-79.
14. Franco, M.A., et al., *Evidence for CD8+ T-cell immunity to murine rotavirus in the absence of perforin, fas, and gamma interferon*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 479-86.
15. Pott, J., et al., *IFN-lambda determines the intestinal epithelial antiviral host defense*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(19): p. 7944-9.
16. Mahlakoiv, T., et al., *Leukocyte-derived IFN-alpha/beta and epithelial IFN-lambda constitute a compartmentalized mucosal defense system that restricts enteric virus infections*. PLoS Pathog, 2015. **11**(4): p. e1004782.
17. Hernandez, P.P., et al., *Interferon-lambda and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection*. Nat Immunol, 2015. **16**(7): p. 698-707.
18. Lin, J.D., et al., *Distinct Roles of Type I and Type III Interferons in Intestinal Immunity to Homologous and Heterologous Rotavirus Infections*. PLoS Pathog, 2016. **12**(4): p. e1005600.
19. Lazear, H.M., T.J. Nice, and M.S. Diamond, *Interferon-lambda: Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond*. Immunity, 2015. **43**(1): p. 15-28.
20. Lee, S. and M.T. Baldridge, *Interferon-Lambda: A Potent Regulator of Intestinal Viral Infections*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 749.
21. Zhu, S., et al., *Nlrp9b inflammasome restricts rotavirus infection in intestinal epithelial cells*. Nature, 2017. **546**(7660): p. 667-670.
22. Bachmann, M.F. and G.T. Jennings, *Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(11): p. 787-96.
23. Bishop, R.F., et al., *Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis*. Lancet, 1973. **2**(7841): p. 1281-3.
24. Flewett, T.H., A.S. Bryden, and H. Davies, *Letter: Virus particles in gastroenteritis*. Lancet, 1973. **2**(7844): p. 1497.

25. Desselberger, U., et al., *Rotaviruses and rotavirus vaccines*. Br Med Bull, 2009. **90**: p. 37-51.
26. Hu, L., et al., *Rotavirus non-structural proteins: structure and function*. Curr Opin Virol, 2012. **2**(4): p. 380-8.
27. Liu, K., et al., *Rotavirus strategies to evade host antiviral innate immunity*. Immunol Lett, 2009. **127**(1): p. 13-8.
28. Trask, S.D., K.M. Ogden, and J.T. Patton, *Interactions among capsid proteins orchestrate rotavirus particle functions*. Curr Opin Virol, 2012. **2**(4): p. 373-9.
29. Estes, M.K. and U. Desselberger, *Rotaviruses: cause of vaccine-preventable disease yet many fundamental questions remain to be explored*. Curr Opin Virol, 2012. **2**(4): p. 369-72.
30. Ruiz, M.C., J. Cohen, and F. Michelangeli, *Role of Ca<sup>2+</sup> in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections*. Cell Calcium, 2000. **28**(3): p. 137-49.
31. Londrigan, S.L., et al., *Growth of rotaviruses in continuous human and monkey cell lines that vary in their expression of integrins*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 9): p. 2203-13.
32. Uzri, D. and H.B. Greenberg, *Characterization of rotavirus RNAs that activate innate immune signaling through the RIG-I-like receptors*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69825.
33. Crawford, S.E., et al., *Rotavirus infection*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17083.
34. Tate, J.E., et al., *Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013*. Clin Infect Dis, 2016. **62 Suppl 2**: p. S96-S105.
35. Walker-Smith, J., *Rotavirus gastroenteritis*. Arch Dis Child, 1978. **53**(5): p. 355-62.
36. Martinez, M., et al., *Whole-genome analyses reveals the animal origin of a rotavirus G4P[6] detected in a child with severe diarrhea*. Infect Genet Evol, 2014. **27C**: p. 156-162.
37. Yen, C., et al., *Rotavirus vaccines: update on global impact and future priorities*. Hum Vaccin, 2011. **7**(12): p. 1282-90.
38. Blutt, S.E., et al., *Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia*. PLoS Med, 2007. **4**(4): p. e121.
39. Ramig, R.F., *Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection*. J Virol, 2004. **78**(19): p. 10213-20.
40. Ball, J.M., et al., *Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein*. Science, 1996. **272**(5258): p. 101-4.

41. Seo, N.S., et al., *Integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 are receptors for the rotavirus enterotoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(26): p. 8811-8.
42. Ousingsawat, J., et al., *Rotavirus toxin NSP4 induces diarrhea by activation of TMEM16A and inhibition of Na<sup>+</sup> absorption*. Pflugers Arch, 2011. **461**(5): p. 579-89.
43. Hyser, J.M., et al., *Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity*. MBio, 2010. **1**(5).
44. Berkova, Z., et al., *Expression of rotavirus NSP4 alters the actin network organization through the actin remodeling protein cofilin*. J Virol, 2007. **81**(7): p. 3545-53.
45. Zambrano, J.L., et al., *Rotavirus infection of cells in culture induces activation of RhoA and changes in the actin and tubulin cytoskeleton*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47612.
46. Desselberger, U. and H.I. Huppertz, *Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection*. J Infect Dis, 2011. **203**(2): p. 188-95.
47. Angel, J., M.A. Franco, and H.B. Greenberg, *Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(7): p. 529-39.
48. Johansen, K. and L. Svensson, *Neutralization of rotavirus and recognition of immunologically important epitopes on VP4 and VP7 by human IgA*. Arch Virol, 1997. **142**(7): p. 1491-8.
49. Kaur, J. and J. Puliyl, *Heat-Stable Oral Rotavirus Vaccine*. N Engl J Med, 2017. **377**(3): p. 302.
50. Kulkarni, P.S., et al., *A randomized Phase III clinical trial to assess the efficacy of a bovine-human reassortant pentavalent rotavirus vaccine in Indian infants*. Vaccine, 2017. **35**(45): p. 6228-6237.
51. Naik, S.P., et al., *Stability of heat stable, live attenuated Rotavirus vaccine (ROTASIL(R))*. Vaccine, 2017. **35**(22): p. 2962-2969.
52. Bhandari, N., et al., *Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet, 2014. **383**(9935): p. 2136-43.
53. Angel, J., M.A. Franco, and H.B. Greenberg, *Rotavirus immune responses and correlates of protection*. Curr Opin Virol, 2012. **2**(4): p. 419-25.
54. Burnett, E., et al., *Rotavirus vaccines: current global impact and future perspectives*. Future Virol, 2016. **11**(10): p. 699-708.

55. Parker, E.P., et al., *Causes of impaired oral vaccine efficacy in developing countries*. *Future Microbiol*, 2018. **13**: p. 97-118.
56. Rha, B., et al., *Intussusception following rotavirus vaccination: an updated review of the available evidence*. *Expert Rev Vaccines*, 2014: p. 1-10.
57. Niess, J.H. and H.C. Reinecker, *Dendritic cells: the commanders-in-chief of mucosal immune defenses*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2006. **22**(4): p. 354-60.
58. Casteleyn, C., et al., *Surface area assessment of the murine intestinal tract as a prerequisite for oral dose translation from mouse to man*. *Lab Anim*, 2010. **44**(3): p. 176-83.
59. Cheroutre, H., F. Lambolez, and D. Mucida, *The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(7): p. 445-56.
60. Turner, J.R., *Intestinal mucosal barrier function in health and disease*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(11): p. 799-809.
61. Olivares-Villagomez, D. and L. Van Kaer, *TL and CD8alpha: Enigmatic partners in mucosal immunity*. *Immunol Lett*, 2010. **134**(1): p. 1-6.
62. Peterson, L.W. and D. Artis, *Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(3): p. 141-53.
63. Hansson, G.C. and M.E. Johansson, *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria*. *Gut Microbes*, 2010. **1**(1): p. 51-54.
64. Kim, Y.S. and S.B. Ho, *Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress*. *Curr Gastroenterol Rep*, 2010. **12**(5): p. 319-30.
65. Kober, O.I., et al., *gammadelta T-cell-deficient mice show alterations in mucin expression, glycosylation, and goblet cells but maintain an intact mucus layer*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014. **306**(7): p. G582-93.
66. Johansson, M.E., et al., *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(39): p. 15064-9.
67. McGuckin, M.A., et al., *Mucin dynamics and enteric pathogens*. *Nat Rev Microbiol*, 2011. **9**(4): p. 265-78.

68. Hooper, L.V. and A.J. Macpherson, *Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 159-69.
69. Macpherson, A.J. and T. Uhr, *Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria*. Science, 2004. **303**(5664): p. 1662-5.
70. Cerutti, A., *The regulation of IgA class switching*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 421-34.
71. He, B., et al., *Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL*. Immunity, 2007. **26**(6): p. 812-26.
72. Xu, W., et al., *Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI*. Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 294-303.
73. Artis, D., *Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 411-20.
74. Qiu, Y. and H. Yang, *Effects of intraepithelial lymphocyte-derived cytokines on intestinal mucosal barrier function*. J Interferon Cytokine Res, 2013. **33**(10): p. 551-62.
75. Lefrancois, L. and N. Lycke, *Isolation of mouse small intestinal intraepithelial lymphocytes, Peyer's patch, and lamina propria cells*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Chapter 3**: p. Unit 3 19.
76. Mowat, A.M., *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(4): p. 331-41.
77. Edelblum, K.L., et al., *Dynamic migration of gammadelta intraepithelial lymphocytes requires occludin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(18): p. 7097-102.
78. Mabbott, N.A., et al., *Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(4): p. 666-77.
79. McDole, J.R., et al., *Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine*. Nature, 2012. **483**(7389): p. 345-9.
80. Smith, P.M. and W.S. Garrett, *The gut microbiota and mucosal T cells*. Front Microbiol, 2011. **2**: p. 111.
81. Ogata, M., et al., *Activation of intra-epithelial lymphocytes; their morphology, marker expression and ultimate fate*. Cell Tissue Res, 2014. **356**(1): p. 217-30.

82. Ferguson, A., *Intraepithelial lymphocytes of the small intestine*. Gut, 1977. **18**(11): p. 921-37.
83. Beagley, K.W., et al., *Differences in intraepithelial lymphocyte T cell subsets isolated from murine small versus large intestine*. J Immunol, 1995. **154**(11): p. 5611-9.
84. Cepek, K.L., et al., *Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin*. Nature, 1994. **372**(6502): p. 190-3.
85. Karecla, P.I., et al., *Recognition of E-cadherin on epithelial cells by the mucosal T cell integrin alpha M290 beta 7 (alpha E beta 7)*. Eur J Immunol, 1995. **25**(3): p. 852-6.
86. Nochi, T., et al., *Biological role of Ep-CAM in the physical interaction between epithelial cells and lymphocytes in intestinal epithelium*. Clin Immunol, 2004. **113**(3): p. 326-39.
87. Inagaki-Ohara, K., et al., *Intraepithelial lymphocytes express junctional molecules in murine small intestine*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(4): p. 977-83.
88. Staton, T.L., et al., *CD8+ recent thymic emigrants home to and efficiently repopulate the small intestine epithelium*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 482-8.
89. Parra, M., et al., *Circulating human rotavirus specific CD4 T cells identified with a class II tetramer express the intestinal homing receptors alpha4beta7 and CCR9*. Virology, 2014. **452-453**: p. 191-201.
90. Mora, J.R., et al., *Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells*. Nature, 2003. **424**(6944): p. 88-93.
91. Iwata, M., et al., *Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 527-38.
92. Kunisawa, J., I. Takahashi, and H. Kiyono, *Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine*. Immunol Rev, 2007. **215**: p. 136-53.
93. Viney, J.L., P.J. Kilshaw, and T.T. MacDonald, *Cytotoxic alpha/beta+ and gamma/delta+ T cells in murine intestinal epithelium*. Eur J Immunol, 1990. **20**(7): p. 1623-6.
94. Montufar-Solis, D., T. Garza, and J.R. Klein, *T-cell activation in the intestinal mucosa*. Immunol Rev, 2007. **215**: p. 189-201.

95. Qiu, Y., Y. Yang, and H. Yang, *The unique surface molecules on intestinal intraepithelial lymphocytes: from tethering to recognizing*. *Dig Dis Sci*, 2014. **59**(3): p. 520-9.
96. Hayday, A., et al., *Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(11): p. 997-1003.
97. Umesaki, Y., et al., *Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus*. *Immunology*, 1993. **79**(1): p. 32-7.
98. Suzuki, H., *Differences in intraepithelial lymphocytes in the proximal, middle, distal parts of small intestine, cecum, and colon of mice*. *Immunol Invest*, 2009. **38**(8): p. 780-96.
99. Lefrancois, L., *Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine*. *J Immunol*, 1991. **147**(6): p. 1746-51.
100. Ohteki, T. and H.R. MacDonald, *Expression of the CD28 costimulatory molecule on subsets of murine intestinal intraepithelial lymphocytes correlates with lineage and responsiveness*. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(6): p. 1251-5.
101. Shires, J., E. Theodoridis, and A.C. Hayday, *Biological insights into TCRgamma delta+ and TCRalpha beta+ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE)*. *Immunity*, 2001. **15**(3): p. 419-34.
102. Lambolez, F., M. Kronenberg, and H. Cheroutre, *Thymic differentiation of TCR alpha beta(+) CD8 alpha alpha(+) IELs*. *Immunol Rev*, 2007. **215**: p. 178-88.
103. Liu, Y., et al., *The crystal structure of a TL/CD8alpha alpha complex at 2.1 A resolution: implications for modulation of T cell activation and memory*. *Immunity*, 2003. **18**(2): p. 205-15.
104. Gangadharan, D., et al., *Identification of pre- and postselection TCRalpha beta+ intraepithelial lymphocyte precursors in the thymus*. *Immunity*, 2006. **25**(4): p. 631-41.
105. Baldwin, T.A., K.A. Hogquist, and S.C. Jameson, *The fourth way? Harnessing aggressive tendencies in the thymus*. *J Immunol*, 2004. **173**(11): p. 6515-20.
106. Guy-Grand, D., et al., *Complexity of the mouse gut T cell immune system: identification of two distinct natural killer T cell intraepithelial lineages*. *Eur J Immunol*, 1996. **26**(9): p. 2248-56.
107. Gangadharan, D. and H. Cheroutre, *The CD8 isoform CD8alpha alpha is not a functional homologue of the TCR co-*

- receptor CD8alpha*. *Curr Opin Immunol*, 2004. **16**(3): p. 264-70.
108. Abadie, V., V. Discepolo, and B. Jabri, *Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology*. *Semin Immunopathol*, 2012. **34**(4): p. 551-66.
  109. Lopez-Guerrero, D.V., et al., *Rotavirus infection activates dendritic cells from Peyer's patches in adult mice*. *J Virol*, 2010. **84**(4): p. 1856-66.
  110. Badillo-Godinez, O., et al., *Targeting of rotavirus VP6 to DEC-205 induces protection against the infection in mice*. *Vaccine*, 2015. **33**(35): p. 4228-37.
  111. De Haan, L. and T.R. Hirst, *Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review)*. *Mol Membr Biol*, 2004. **21**(2): p. 77-92.
  112. Kawamura, Y.I., et al., *Cholera toxin activates dendritic cells through dependence on GM1-ganglioside which is mediated by NF-kappaB translocation*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(11): p. 3205-12.
  113. Armstrong, M.E., et al., *Proinflammatory responses in the murine brain after intranasal delivery of cholera toxin: implications for the use of AB toxins as adjuvants in intranasal vaccines*. *J Infect Dis*, 2005. **192**(9): p. 1628-33.
  114. van Ginkel, F.W., et al., *Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues*. *J Immunol*, 2000. **165**(9): p. 4778-82.
  115. Couch, R.B., *Nasal vaccination, Escherichia coli enterotoxin, and Bell's palsy*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(9): p. 860-1.
  116. Lewis, D.J., et al., *Transient facial nerve paralysis (Bell's palsy) following intranasal delivery of a genetically detoxified mutant of Escherichia coli heat labile toxin*. *PLoS One*, 2009. **4**(9): p. e6999.
  117. Fukuyama, Y., et al., *Nasal Administration of Cholera Toxin as a Mucosal Adjuvant Damages the Olfactory System in Mice*. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0139368.
  118. Starkhammar, M., et al., *Intranasal administration of poly(I:C) and LPS in BALB/c mice induces airway hyperresponsiveness and inflammation via different pathways*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e32110.
  119. Ank, N., et al., *An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity*. *J Immunol*, 2008. **180**(4): p. 2474-85.

120. Stahl-Hennig, C., et al., *Synthetic double-stranded RNAs are adjuvants for the induction of T helper 1 and humoral immune responses to human papillomavirus in rhesus macaques*. PLoS Pathog, 2009. **5**(4): p. e1000373.
121. Suzuki, H., et al., *Regional variations in the distribution of small intestinal intraepithelial lymphocytes in three inbred strains of mice*. J Vet Med Sci, 2000. **62**(8): p. 881-7.
122. Suzuki, H., *Age-dependent changes in intraepithelial lymphocytes (IELs) of the small intestine, cecum, and colon from young adult to aged mice*. Arch Gerontol Geriatr, 2012. **55**(2): p. 261-70.
123. Swamy, M., et al., *Intestinal intraepithelial lymphocyte activation promotes innate antiviral resistance*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7090.