



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
FACULTAD DE MEDICINA**

**SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN**

**COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO**

**“Análisis de los mecanismos de protección contra la infección  
por rotavirus en un modelo murino de vacunación intranasal”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN MEDICINA MOLECULAR  
QUE PRESENTA:**

**Biol. GIOVANNA IVETH JUAREZ POPOCA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA**

**Cuernavaca, Morelos, México Mayo, 2023**

### **Lugar donde se realizó la tesis:**

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio 1 de Inmunología Viral de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en el periodo 2020-2022

### **Miembros del comité tutorial:**

Tutor principal: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Tutor personal: Dr. José Luis Montiel Hernández

1er. Vocal: Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

2do. Vocal: Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez

3er. Vocal: Dra. Gabriela Rosas Salgado

### **Miembros del jurado de examen:**

Presidente: Dra. Gabriela Rosas Salgado

Secretario: Dr. José Luis Montiel Hernández

1er. Vocal: Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

2do. Vocal: Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez

3er. Vocal: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

### **Fuente de financiamiento:**

El más sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el vital apoyo financiero a través de la beca (CVU:1020432) otorgada durante estos dos años.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Fernando Esquivel por ser un excelente mentor, aun en medio de una pandemia, sus conocimientos y apoyo han trascendido más allá del área académica.

A la Dra. Vanessa López por transmitir con tanta dedicación y paciencia su amor por la inmunología.

A las compañeras del laboratorio de inmunología viral, Alicia, Karina y Yael, con las que compartí varios logros y desaciertos en los experimentos, pero siempre de una manera muy divertida y resiliente, también a los compañeros Omar, Abad y Cristian, por sus valiosas contribuciones.

A los amigos que me han acompañado y apoyado; Esau, Jazmin, Liliana, Linda, Darely, Sara y David, ustedes representan un lugar seguro para recargar mis energías y ánimos.

A Ollin por compartir sin límites conmigo sus distintas formas de conocer, cuestionar y explorar la vida, siempre a través del respeto y el amor, - / .- - - - - j

Dedico este trabajo a mis padres Israel Juárez y Leonor Popoca, gracias por todo su apoyo y amor incondicional, si volviera a nacer los elegiría otra vez como guías en esta vida.

A mis hermanos Emir, Israel y Jeniffer, por ser una gran fuente de alegría y ternura, porque siempre al reír junto a ustedes, siento que formamos lazos inquebrantables.

A Gio de 5 años, solo mira hasta donde has llegado.

# Índice

Resumen .....	- 6 -
1. Introducción .....	- 7 -
1.1 Rotavirus .....	- 7 -
1.1.1 Estructura .....	- 7 -
1.1.2 Clasificación .....	- 9 -
1.1.3 Epidemiología .....	- 10 -
1.1.4 Replicación .....	- 12 -
1.1.5 Patogénesis .....	- 14 -
1.1.5.1 Infección intestinal por RV .....	- 14 -
1.1.5.2 Fisiopatología de diarrea inducida por RV .....	- 15 -
1.1.5.3 Inducción de diarrea por RV .....	- 16 -
1.2 Sistema inmune de mucosas .....	- 17 -
1.2.1 Respuesta inmune innata en mucosas .....	- 19 -
1.2.2 Respuesta inmune adaptativa en mucosas .....	- 20 -
1.2.3 Anatomía de GALT .....	- 21 -
1.2.3.1 Linfocitos intraepiteliales intestinales (IEL) .....	- 24 -
1.2.3.2 Migración de los IEL hacia el intestino .....	- 26 -
1.2.4 Respuesta inmune en GALT .....	- 27 -
1.2.4.1 Respuesta inmune innata en GALT .....	- 27 -
1.2.4.1.1 Citocinas en respuesta inmune en GALT .....	- 27 -
1.2.4.2 Respuesta inmune adaptativa en GALT .....	- 32 -
1.2.5 Respuesta inmune contra Rotavirus .....	- 33 -
1.2.5.1 Respuesta inmune innata contra RV .....	- 33 -
1.2.5.1.1 Citocinas inducidas ante infección por RV .....	- 36 -
1.2.5.2 Respuesta inmune adaptativa contra RV .....	- 36 -
1.2.6 Vacunas contra Rotavirus .....	- 37 -
1.2.6.1 Introducción de vacunas contra RV en México .....	- 39 -
2. Antecedentes .....	- 42 -
2.1 VP6 como candidato a vacuna contra rotavirus .....	- 42 -
2.2 INF- $\lambda$ como regulador de infección por Rotavirus .....	- 43 -
2.3 Vacunación intranasal ante infección por Rotavirus .....	- 44 -

3. Justificación .....	- 46 -
4. Hipótesis .....	- 47 -
5. Objetivos.....	- 47 -
6. Metodología.....	- 48 -
7. Resultados.....	- 54 -
7.1. Montaje del modelo de vacunación i.n. con el péptido de VP6 <sub>289-302</sub> .....	- 54 -
7.2 Efecto de la vacunación sobre la producción de citocinas por las células epiteliales intestinales y linfocitos intraepiteliales en respuesta a la infección por rotavirus .....	- 55 -
8.- Discusión.....	- 64 -

## Resumen

Estudios previos en el modelo de ratón han demostrado que el péptido sintético correspondiente a la secuencia 289-302 (RLSFQLMRPPNMTP) de la proteína interna de rotavirus VP6, que es un epítipo de células Th restringido por la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II IE<sup>d</sup>, es sumamente eficiente induciendo una respuesta protectora contra la infección a nivel intestinal cuando es inoculado i.n. en presencia de Toxina de cólera (TC) como adyuvante. Esta protección es totalmente dependiente de células Th1 y parcialmente dependiente de CD40, sin embargo, aún no es claro como las células Th epítipo específicas inducidas en el epitelio nasal ejercen su función protectora contra la infección en el epitelio intestinal. Por otro lado, estudios recientes han sugerido que existe una correlación de la producción de interferón (IFN)- $\lambda$  por parte de las células epiteliales intestinales y la eliminación del rotavirus en una infección. El objetivo de este proyecto se centra en analizar la cinética de producción de IFN- $\lambda$  tanto en las células intraepiteliales intestinales como en las células epiteliales por RT-PCR. De manera que, ratones BALB/c adultos fueron inoculados i.n. con 50  $\mu$ g del péptido sintético 289-302 de VP6 en presencia de 2.5  $\mu$ g de TC como adyuvante. Después de 21 días, se dio un refuerzo, y 21 días después los ratones fueron infectados por la vía intragástrica con el rotavirus murino EDIM. A los días 0, 2, 5 y 8 post-infección se obtuvo el intestino y se aislaron los linfocitos intraepiteliales y las células epiteliales. Se aisló el RNAm y los niveles del mensaje para IFN- $\lambda$  se evaluó por RT-PCR usando oligos específicos. Los resultados preliminares mostraron que tanto en los linfocitos intraepiteliales como en las células epiteliales intestinales de ratones vacunados, se presentaron mayores niveles de mensaje para IFN- $\lambda$  dentro de los primeros 4 días post-infección, en comparación con los ratones control inoculados solamente con adyuvante. Este resultado sugiere que la vacunación induce un estado antiviral temprano tanto en los linfocitos intraepiteliales como en las células epiteliales, que podría estar correlacionado con la protección inducida. Es importante que en trabajos futuros se corrobore y amplíe este resultado.

## **1. Introducción**

### **1.1 Rotavirus**

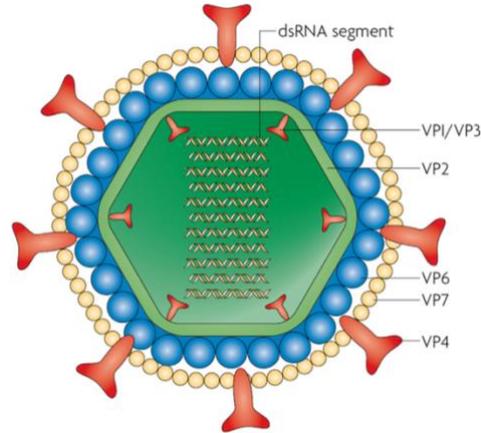
Los rotavirus (RV) fueron reconocidos como una de las causas principales de gastroenteritis aguda (GEA) en bebés e infantes humanos (Bishop *et al.*, 1973; Flewett *et al.*, 1973). Durante las últimas 4 décadas, se ha generado una enorme cantidad de investigación básica sobre la estructura, replicación y patogénesis del RV; así como la naturaleza de la respuesta inmune contra este patógeno. Como resultado de esto, han sido introducidas en muchos países dos vacunas contra la gastroenteritis severa, basadas en virus atenuados (Rotateq y Rotarix), lo cual ha incidido directamente en un decremento en gastroenteritis severas a nivel mundial. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado la generación de vacunas basadas en proteínas antigénicas del RV, que induzcan una respuesta heterotípica (varios serotipos de RV) contra serotipos circulantes y también contra posibles nuevos serotipos que surjan en la población humana. De esta manera, es de suma importancia continuar con los estudios de la respuesta inmune contra este virus en infección y en vacunas experimentales de nueva generación, para entender mejor los mecanismos de protección inmunológica.

#### **1.1.1 Estructura**

Los RV son miembros del género *Rotavirus* de la familia *Reoviridae*. Por microscopía electrónica el rotavirus se asemeja a una rueda y esta singular apariencia ha dado lugar al nombre de Rotavirus para el género. Las partículas de rotavirus o viriones tienen un diámetro aproximado de 1000 Å, son virus de ARN bicatenario (dsRNA) sin envoltura lipídica y están constituidos por 3 capas concéntricas de proteínas que engloba un genoma de 11 segmentos de dsRNA. Los segmentos de ARN codifican para seis proteínas virales estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7, del inglés “Viral Protein”) y seis proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6, del inglés “Non- structural”) (Tabla 1) (Crawford *et al.*, 2017)

Tabla 1. Genes y proteínas del Rotavirus			
Segmento del ARN (gen)	Proteína	Localización	Función
1	VP1	Vértices del núcleo	ARN polimerasa ARN dependiente
2	VP2	Forma capa interna del núcleo	Estimula la RNA polimerasa
3	VP3	Vértices del núcleo	Enzima guanilil transferasa de ARNm
4	VP4	Protuberancias superficiales	Entrada a la célula, virulencia, sensible a proteasa y blanco de anticuerpos neutralizantes.
5	NSP1	No estructural	Antagonista de interferón
6	VP6	Cápside intermedia	Estructural y especificidad de grupo.
7	NSP3	No estructural	Aumenta actividad de ARNm viral y finaliza la síntesis de proteínas celulares
8	NSP2	No estructural	NTPasa involucrada en el empaquetamiento de ARN
9	VP7	Superficie	Entrada a la célula y blanco de anticuerpos neutralizantes.
10	NSP4	No estructural	Enterotoxina
11	NSP5/NSP6	No estructural	Moduladora de la unión del ARNs y ARNs

Por su parte, las proteínas VP7 y VP4 constituyen la capa externa del virus y están involucradas en la entrada del virus a la célula huésped. Asimismo, son los blancos de anticuerpos neutralizantes, que definen los diferentes serotipos. Para que RV sea infeccioso, VP4 tiene que ser cortado con tripsina, lo que genera dos dominios en esta molécula; un dominio globular distal a la superficie del virus llamado VP8 y un dominio tipo tallo proximal llamado VP5. Por otra parte, VP6 constituye la capa intermedia y es la proteína viral más conservada en todas las cepas virales, así como una de las más inmunogénicas. VP2 constituye la capa interna que rodea al genoma de dsRNA. VP1 y VP3 están asociadas al genoma, VP1 es la polimerasa y viral y VP3 actúa como guanililtransferasa (Figura 1). Las proteínas no estructurales están involucradas en la morfogénesis viral, patogénesis y en el control de la respuesta inmune innata (Crawford *et al.*, 2017)



**Figura 1.** Representación esquemática del virión de Rotavirus. Tomada de Angel *et al.*, 2007

### 1.1.2 Clasificación

Los rotavirus constituyen el género Rotavirus, uno de los 15 géneros de la familia Reoviridae que se subdivide en las subfamilias de Sedoreovirinae (géneros Cardoreovirus, Mimoreovirus, Orbivirus, Phytoreovirus, Rotavirus, Seadornavirus) y Spinareovirinae (géneros Aquareovirus, Coltivirus, Dinovernavirus, Fijivirus, Idnoreovirus, Mycoreovirus, Orthoreovirus, Oryzavirus).

Las cepas de rotavirus poseen una alta diversidad genética y antigénica, son clasificadas en tres diferentes categorías, grupo, subgrupo y serotipo. Los grupos de RV se clasifican de acuerdo con la especificidad de anticuerpos para proteína estructural VP6, la más abundante de la estructura del virión. Actualmente, son reconocidos 10 grupos designados con las letras A hasta J (RVA- RVJ). Los rotavirus del grupo A, B y C son responsables de la mayoría de las infecciones tanto en seres humanos como animales, mientras que los grupos D a G solo han sido identificados en huéspedes animales (Crawford *et al.*, 2017). El grupo A es el más común en humanos, este a su vez se subdivide en tres diferentes genogrupos, basados en características comunes que comparten con tres cepas prototipo humanas Wa, DS-1 y AU-1 (Parra *et al.*, 2014)

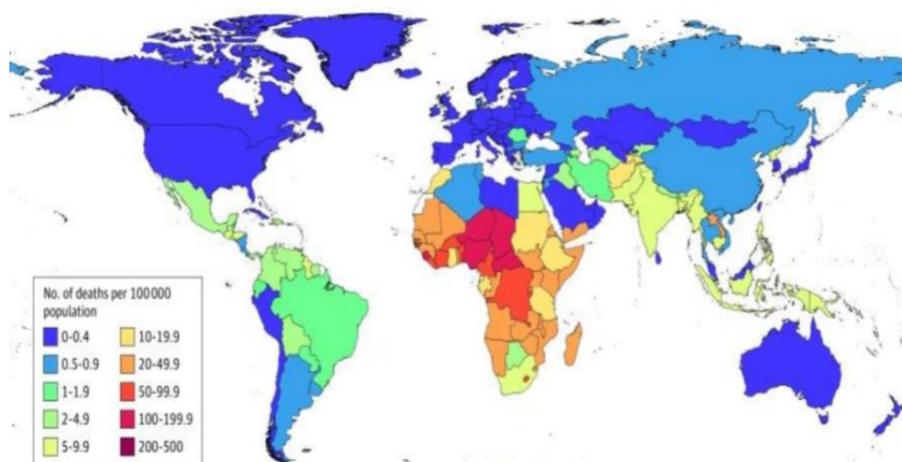
En 1985, se propuso un sistema de clasificación binario basado en la reactividad serológica de VP7 y VP4. Los rotavirus se clasificaron en serotipos G (G para la glicoproteína VP7) y serotipos P (P para la proteína VP4 sensible a la proteasa), seis cepas de rotavirus del grupo A generalmente representan más del 90% de la especie que circula a nivel mundial: G1P [8], G2P [4], G3P [8], G4P [8], G9P [8] y G12P [8] (Crawford *et al.*, 2017)

A partir de febrero de 2018, se describieron 36 genotipos G y 51 genotipos P en la base de datos mantenida por el grupo de trabajo de clasificación de rotavirus (RCWG, del inglés, “Rotavirus Classification Working Group”). En 2008, se creó un sistema de categorización del genoma completo basado en secuenciación para rotavirus del grupo A, mediante el cual se asignó un genotipo específico a cada uno de los 11 segmentos del genoma de dsRNA. Las abreviaturas Gx-P [x] -Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (donde x es un número arábigo, a partir de 1) se utiliza para describir a VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5, respectivamente (WHO, 2020)

### **1.1.3 Epidemiología**

Los rotavirus son virus ubicuos y están asociados con aproximadamente el 20% de las enfermedades diarreicas graves que requieren hospitalización en niños menores de 5 años, en todo el mundo. En 2003, se reportaron 114, millones de casos de infección por rotavirus en niños a nivel mundial, de los cuales 24 millones tuvieron manejo ambulatorio y 2,3 millones de casos requirieron hospitalización (Crawford *et al.*, 2017). Los RV son muy contagiosos por las siguientes razones: (1) un número bajo de partículas virales (número de partículas virales/unidades infecciosas) es suficiente para infectar exitosamente a un individuo susceptible; (2) las partículas de rotavirus se eliminan en grandes cantidades en las heces (hasta  $10^{11}$  partículas/ml) durante la etapa aguda de la infección o durante períodos más largos por los huéspedes inmunocomprometidos infectados; y (3) las partículas de RV son muy resistentes a las condiciones ambientales. La vía de transmisión suele ser fecal-oral, donde el período de incubación es corto (1–2 días). La asistencia a guarderías infantiles es un factor de riesgo para adquirir una infección sintomática del RV. Sin embargo, también han observado pequeñas epidemias de RV entre los adultos mayores (en asilos, salas geriátricas, etc.). Las infecciones nosocomiales por RV son frecuentes y difíciles de eliminar.

Antes de la vacunación, los RV causaron 3 millones de episodios de enfermedad por año, requiriendo 500,000 visitas a un médico y 60,000 hospitalizaciones (Fischer *et al.*, 2007). Se encontraron números similares en Europa, excepto que el número de muertes fue de aproximadamente 200. En África y en algunos países del sur de Asia, la patología por RV está asociada con una alta mortalidad (Parashar *et al.*, 2009; Tate *et al.*, 2012). A pesar de la gran diversidad genómica y antigénica de los RV, globalmente solo un pequeño número de tipos de RV ha prevalecido en humanos durante las últimas 3 décadas: RV de los tipos G1P1A [8], G2P1B [4], G3P1A [8], G4P1A [8], y más recientemente G9P1A [8] y G12P1A [8] han circulado en alta frecuencia, contribuyendo al 80-90% de todas las infecciones de RV en América del Norte, Europa y Australia (Gentsch *et al.*, 2005; Santos y Hoshino, 2005; Iturriza-Gómara *et al.*, 2004) (Figura 2)



**Figura 2.** Estimación de la mortalidad por enfermedad causada por Rotavirus. Tomada de Tate *et al.*, 2012

Específicamente en la región de América Latina y el Caribe, previo a la vacunación, se estimó que el rotavirus causaba alrededor de 75,000 hospitalizaciones, en esta zona, el tipo más común de rotavirus era G1 (Guzmán *et al.*, 2021). En México el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) se han encargado de llevar un seguimiento tanto de los genotipos predominantes, así como el número de casos, en donde reportan que, del año 2000 a 2014, el genotipo de rotavirus más común es G1 (Gómez y Carrión, 2019)

### 1.1.4 Replicación

Una de las propiedades clave para el éxito del rotavirus como patógeno gastrointestinal, es la cápside de triple capa, lo cual le confiere estabilidad, esto le facilita la transmisión fecal-oral y la internalización del virus al intestino delgado donde infecta a los enterocitos maduros de las puntas de las vellosidades. Los RV tienen un tropismo celular específico, infectando principalmente las células epiteliales maduras del intestino delgado (IEC, del inglés “intestinal epithelial cells”) (Dormitzer *et al.*, 2002).

La replicación viral tiene como paso inicial la unión del virus a receptores específicos, que se da por la interacción de TLP mediante VP4 con receptores celulares de unión, que incluyen ácido siálico (SA) ubicado en las posiciones terminales o subterminales. Por acción de digestión proteolítica por tripsina, VP4 de la capa externa sufre escisión, lo que resulta en la generación de los fragmentos VP5\* y VP8\*. Posteriormente, VP8 y VP7 interactúan con una variedad de correceptores e integrinas ( $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha v\beta$  y  $\alpha x\beta 2$ ) y hsc70, ubicados en microdominios lipídicos de la membrana celular (Suzuki 2019). Se desconoce si las interacciones tienen un orden o si ocurren secuencialmente, además no todas las cepas de RV requieren integrinas, pero si es necesaria la unión a hsc70 (Arias *et al.* 2015). La unión de RV a la superficie de las células está mediada también por sialoglicanos, como los gangliosidos GM1 y GM1a y los antígenos del grupo sanguíneo del huésped (HBGA), esta última interacción depende del genotipo de RV (Bohm *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2012). Después de la unión de RV a los receptores de las células, los RV se internalizan por vías endocíticas dependientes o independientes de clatrina, según la cepa del virus (Arias *et al.* 2015). La mayoría de los RV, incluida las cepas humanas (Wa, DS-1, WI69, nar3) y animales (UK, YM, SA11.4S), ingresa a la célula mediante endocitosis mediada por clatrina. Estudios recientes mostraron que la proteína VP4 define la vía endocítica utilizada (Díaz *et al.*, 2014)

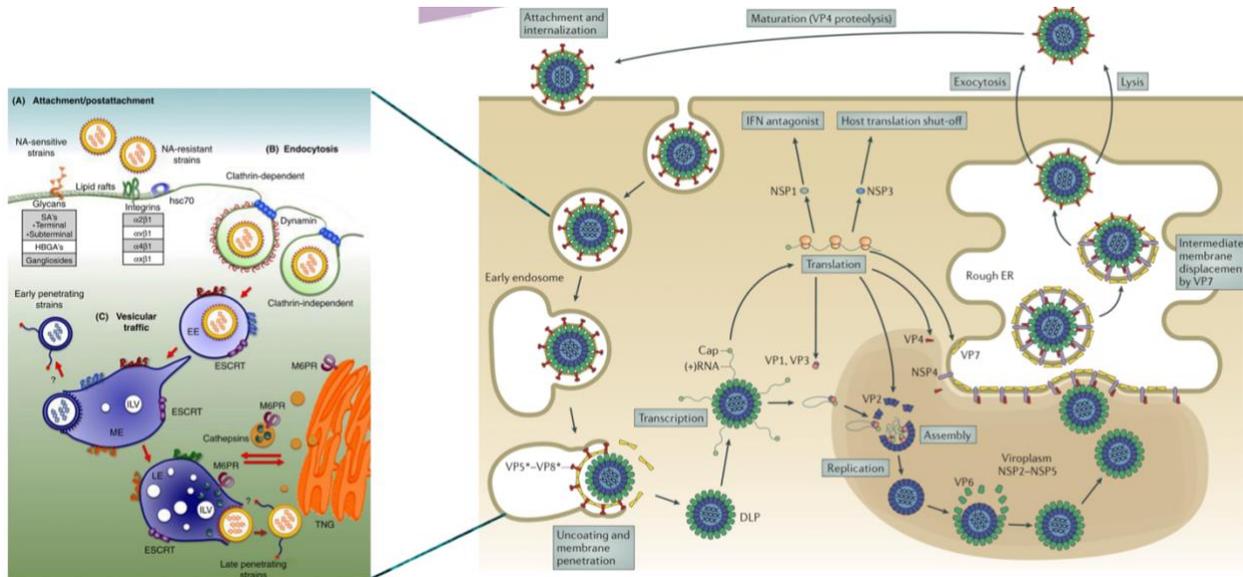
Posterior a la endocitosis, la disminución de calcio en los endosomas promueve la liberación de VP7, y se cree que VP5 sufre un reordenamiento (conformación plegada), lo que conduce a una interacción de un dominio hidrófobo de esta subunidad con la membrana endosomal ocasionando su ruptura. Las partículas de doble capa (DLP) son liberadas en el citoplasma,

el complejo de polimerasa (VP1 y VP3), se activan para transcribir ARN de sentido positivo (11 segmentos de ARN bicatenario). Para iniciar la replicación, la polimerasa VP1 debe estar unida a la proteína VP2, esta interacción es requerida para la activación enzimática de VP1. Los canales de clase I en los vértices del RV aumentan de diámetro, lo que permite la liberación del RNA de cadena sencilla (ARNss). Cuando ya se ha realizado la transcripción, los NSP de RV llevan a cabo los pasos de replicación del genoma y el ensamblaje viral (Pesavento *et al.*, 2006)

La replicación y el empaquetamiento del genoma viral en las cápsides virales se lleva a cabo en zonas específicas del citoplasma llamadas, viroplasmos, que se forman en una etapa temprana de la infección. Son estructuras grandes, densas, no unidas a la membrana, ricas en ARN y proteínas virales (VP1, VP2, VP3 y VP6) y proteínas no estructurales (NSP2, NSP5 y NSP6). Los ARNss liberados sirven como plantilla para la traducción de las proteínas de RV o quedan retenidos en el viroplasma para ser empaquetados en nuevas partículas virales. Se tiene poca información sobre las estructuras de los primeros intermediarios de ensamblaje, una de las razones es el hecho de que en el viroplasma donde se encuentran no pueden resolverse mediante microscopía electrónica (Long, 2017). NSP2 y NSP5 colocalizan alrededor de la transcripción de DLP y son necesarios para la nucleación del viroplasma y la replicación del virus. NSP5 se autoasocia e interactúa con ARN y NSP2. Las interacciones de NSP5 y NSP2 sugieren que el viroplasma se forma como grandes redes diseñadas para secuestrar ARN virales y proteínas de cápside para ensamblar nuevos viriones. Los ARN (+) de RV en viroplasma se empaquetan selectivamente en núcleos de VP2 y VP1 replica el genoma de ARN de doble cadena (Suzuki, 2019)

El proceso mediante el cual la partícula de ensamblaje penetra la membrana del retículo endoplasmático (RE) para adquirir su capa externa, es de los menos comprendidos. La superficie de unión al RE tiene una superficie lisa, mientras que la zona que no se une, es irregular. La perforación de la membrana del RE es causada por un mecanismo desconocido llevado a cabo por la interacción entre NSP4 y VP6. Observaciones por EM sugieren la formación de un complejo hetero-oligomérico entre NSP4, VP4 y VP7; estas dos últimas se pliegan sobre las DLP y dan como resultado la TLP (Trask y Dormitzer 2006). Dado que la

superficie de TLP se asocia al RE mediante VP7, es necesario que las partículas se desprendan. Este mecanismo preciso no se comprende del todo (Suzuki, 2019). El ciclo de infección termina cuando RV es liberado por lisis de la célula huésped (Figura 3)



**Figura 3.** Ciclo de replicación del Rotavirus. Tomada de Crawford *et al.* 2012

## 1.1.5 Patogénesis

### 1.1.5.1 Infección intestinal por RV

Después de la transmisión fecal-oral del RV, la infección es iniciada en el intestino, la gravedad y la localización de la infección intestinal por rotavirus varía entre las especies animales; sin embargo, los cambios patológicos se limitan casi exclusivamente al intestino delgado. La infección puede presentarse de manera asintomática o sintomática. El resultado de la infección se ve afectado por factores virales y del huésped. El desarrollo de la infección depende de la edad del huésped, en el caso de los recién nacidos infectados por RV rara vez presentan una enfermedad sintomática. La protección puede estar dada por la transferencia de anticuerpos maternos a través de la placenta. RV puede infectar adultos, sin embargo, la enfermedad sintomática grave es relativamente poco común. La virulencia del RV es multigénica y se ha asociado con genes que participan en procesos como la replicación del ARN viral (gen 3), replicación de la cápside externa (genes 4 y 9), antagonismo de interferón

por NSP1 (gen 5) así como el gen que codifica la endotoxina NSP4 (gen 10) (Greenberg y Estes., 2009)

La manifestación clínica principal de la infección por RV es la diarrea en lactantes y niños pequeños. Algunas de las características de la diarrea inducida por RV y que son distintivas de la diarrea inducida por las bacterias es que se observa poca inflamación en el intestino, no es sanguinolenta y además dura poco tiempo (Greenberg., 2009)

### **1.1.5.2 Fisiopatología de diarrea por RV**

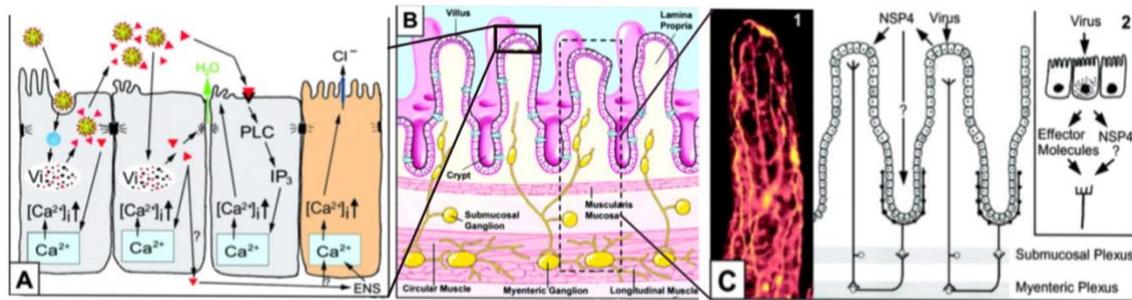
Los enterocitos que recubren el intestino delgado generalmente se dividen en dos tipos: enterocitos y células de las criptas. Los enterocitos son células maduras no proliferantes que cubren las vellosidades y tienen funciones digestivas o de absorción. La absorción ocurre por difusión pasiva de los solutos a lo largo de gradientes electroquímicos u osmóticos, como por transporte activo. El epitelio que recubre las criptas es el progenitor de los enterocitos en las vellosidades. Las células de la cripta carecen de microvellosidades bien definidas y de la función de absorción y secretan activamente iones  $Cl^-$  hacia la luz intestinal. La actividad combinada de ambos tipos de células resulta en el flujo bidireccional de electrolitos y agua a través del epitelio (Raming, 2004)

El conocimiento sobre la fisiopatología del rotavirus deriva principalmente de modelos animales. Los RV se replican en los enterocitos maduros que no se dividen, esto sugiere que los enterocitos diferenciados expresan factores necesarios para una eficiente infección y replicación. En general se considera que la diarrea es malabsortiva, posterior a la destrucción de los enterocitos. La malabsorción da como resultado el paso de mono y disacáridos, carbohidratos, grasas y proteínas no digeridos hacia el colon. Se ha propuesto también un factor secretor de la diarrea, basado en niveles elevados de prostaglandina E, la secreción de 5-hidroxitriptamina (5-HT o serotonina) mediada por la infección por RV puede activar vías de señalización que inducen diarrea y vómitos (Hagbom *et al* 2011). Adicionalmente, NSP4 o ciertos péptidos de esta, tienen actividad similar a toxina e inducen diarrea cuando se inoculan en ratones. Por tanto, la diarrea por RV es multifactorial, resultado de efectos directos de la infección, efectos indirectos y la respuesta del huésped. De tal modo que la

diarrea inducida por rotavirus tiene dos mecanismos propuestos: diarrea osmótica, por mala absorción y diarrea secretora, debido a los efectos de NSP4 y activación del sistema nervioso entérico (SNE) (Crawford *et al* 2017)

### 1.1.5.3 Inducción de diarrea por RV

El paso inicial que provocara la diarrea es la unión del RV a los enterocitos del intestino delgado, esta unión es mediada por diversos receptores. Una vez que el virus es internalizado y ha perdido su cápside externa, las proteínas virales comienzan a transcribirse, por lo cual aumenta la concentración de estas. Los eventos intracelulares relacionados con NSP4, provocan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático, el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  desencadena alteraciones en el citoesqueleto, disminución de la expresión de disacáridos y otras enzimas en la superficie celular, inhibición en los sistemas de co-transporte de  $\text{Na}^+$  y, finalmente, necrosis. NSP4 puede liberarse a través de una vía secretora no clásica (Brunet *et al.*, 2000). NSP4 irrumpe las uniones estrechas, permitiendo el flujo de agua y electrolitos, también se une a un receptor específico en la célula y desencadena una cascada de señalización a través de fosfolipasa (PLC) e inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) que da como resultado la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y, por tanto, un aumento de su concentración que activan los canales de cloruro dependientes de calcio (Hyser *et al.*,2010)



**Figura 4.** El panel A. Representa eventos en el epitelio infectado. B) Arquitectura normal del intestino delgado, enfatizando el SNE y sus ganglios en diferentes niveles submucosos, C) Arco reflejo del SNE que recibe señales del epitelio y vellocidades y activa el epitelio de la cripta. Tomada de Raming 2004

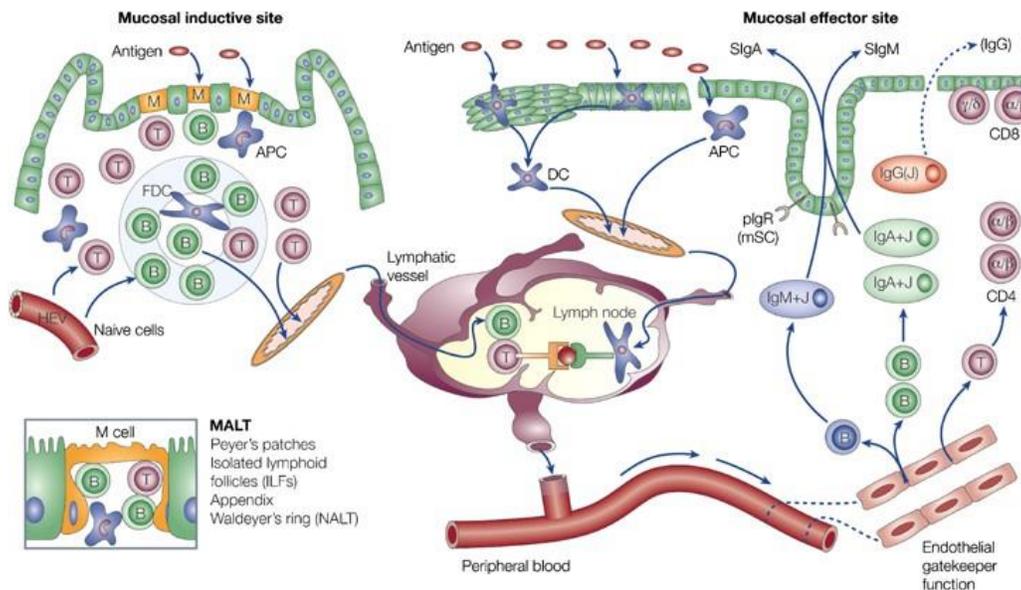
La activación de estos canales provoca secreción excesiva de iones cloruro en la luz intestinal, creando un gradiente osmótico que facilita el transporte de agua hacia el intestino, lo que da lugar a diarrea secretora. NSP4 puede estimular el SNE, lo que a su vez provoca un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  lo que induce la secreción de  $\text{Cl}^-$  (Lundgren y Svensson., 2003). El aumento de calcio intracelular puede inducir la secreción de 5-HT de las células entero-endocrinas en humanos y ratones, lo que puede activar los nervios entéricos que inervan el intestino delgado y conducir a la motilidad intestinal (Raming, 2004) (Figura 4)

## **1.2 Sistema inmune de mucosas**

El sistema inmune de las mucosas (SIM) proporciona una interfaz de defensa al interactuar directamente con el medio ambiente exterior, abarcando gran área de superficie, estas cubren cavidad oral, tracto respiratorio, cavidad ocular, cavidad del oído y tracto genitourinario (Holmgren y Czerkinsky 2005). Brinda protección contra organismos patógenos a la vez que mantiene un estado de tolerancia contra las bacterias comensales y los antígenos ingeridos en alimentos, adicionalmente tienen diversas tareas como absorción, transporte de macromoléculas y funciones secretoras. El SIM tiene un funcionamiento independiente como un órgano inmunitario diferente del sistema inmune sistémico, sin embargo, ambos comparten una variedad de mecanismos de protección, ampliando así la posibilidad de mantener la homeostasis (Fujihashi y Mc Ghee 2012)

El SIM está constituido por una red de tejidos interconectados, y a su vez compartimentado, cuenta con células linfoides y no linfoides, moléculas efectoras como anticuerpos, quimiocinas, citocinas, células presentadoras de antígeno (CPA) como macrófagos, células dendríticas (CD), células dendríticas foliculares (CDF), células B y T (Brandtzae., 2009). Todas ellas se distribuyen en varios tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT, del inglés, “mucosal-associated lymphoid tissues”), la red de mucosas es conformada por GALT (del inglés, “gut-associated lymphoid tissue”), BALT (del inglés, “bronchoepithelium and lower respiratory tract”), NALT (del inglés, “nasopharynx associated lymphoid tissue”) y LALT (del inglés, “Larinx associated lymphoid tissue”) (Fujihashi y Mc Ghee 2012 ). Estructural y funcionalmente los tejidos de las mucosas se dividen en sitios para la captación y

procesamiento de antígenos llamados “sitios inductores”, en donde los antígenos extraídos de las superficies de las mucosas estimulan los linfocitos T y B, y “sitios efectores”, donde las células efectoras después de la extravasación, retención y diferenciación, realizan su acción (Neurath *et al.*, 2001)



**Figura 5.** Sitios inductores y efectores del sistema inmune de mucosas. Tomado de Brandtzae *et al.*, 2007

Los sitios inductores están constituidos por MALT, específicamente GALT, NATL y nodos linfáticos (NL), estos sitios están equipados con células que muestrean antígenos, un tipo de célula que cumple con esta función son las llamadas “microfold” o células M, las cuales fagocitan microorganismos y antígenos a través de la superficie epitelial para posteriormente ser procesados por las CPA e iniciar la respuesta inmune (Neurath *et al.*, 2001). Las células M cuentan con microvellosidades cortas, glicocálix reducido y una membrana basolateral profundamente invaginada, estas características facilitan la transcitosis de los antígenos, sin embargo, esta ruta puede ser una oportunidad de invasión para varios patógenos (Whershil y Furuta., 2007). En cuanto a los sitios efectores, incluyen regiones de GALT, tracto reproductor femenino y tejidos secretores (mamario, lagrimal, salival, etc.), cuentan también con células efectoras específicas de antígeno, células B y T de memoria (Fujihashi y Mc Ghee 2012)

Cuando las CPA captan un antígeno migran por medio de los vasos linfáticos a los NL donde se convierten en células activas y estimulan las células T. Las células T y B naive entran en MALT y en ganglios linfáticos a través de vénulas del epitelio alto (HEV), después de estar preparados para convertirse en células T y B de memoria/efectoras, migran desde MALT y los ganglios linfáticos a través de la linfa y el torrente sanguíneo para su posterior extravasación a los sitios efectores, como la lámina propia y el pulmón, donde pueden inducir respuestas inmunitarias. Este proceso es dirigido por un conjunto de moléculas de adhesión y quimiocinas expresadas en la microvasculatura, ejerciendo así en las células endoteliales un direccionamiento local (Brandtzae, 2009)

### **1.2.1 Respuesta inmune innata en mucosas**

La primera línea de defensa ante infecciones es la inmunidad innata, que cuenta con barreras de superficie, células fagocíticas (p. ej., granulocitos y macrófagos) y CD, los cuales evitan la invasión y persistencia de agentes extraños dentro del tejido, también consta de barreras físicas (revestimiento epitelial, moco), peristalsis, factores químicos (pH, péptidos antimicrobianos), la respuesta se caracteriza por efectuarse con rapidez y no genera memoria ante una nueva exposición. Ante una posible invasión por algún microorganismo, la respuesta innata inicia con la detección de estructuras conservadas presentes en varios microorganismos (lipopolisacáridos, ácidos teicoicos, flagelina, ARN viral ds, y motivos CpG no metilados en el ADN) pero que no están presentes en las células de mamíferos; se pueden reconocer también células del huésped dañadas (Brandtzae *et al.*, 2007). Los productos microbianos que activan la inmunidad innata reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's, del inglés, "pathogen-associated molecular pattern") y los receptores celulares que se unen a estas estructuras conservadas se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés, "pattern recognition receptor"). Los PRR's se clasifican en: receptores tipo Toll (TLR, del inglés, "Toll like receptor"), receptores similares a RIG-I o RLR (del inglés, "RIG-I like receptors"), receptores que contienen el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD, del inglés, "nucleotid-binding oligomerization") (Dwivedy y Aich 2011), los cuales pueden ser

clasificados de acuerdo a su afinidad al ligando, función o ubicación celular (Jensen y Thomsen 2012). La activación de los PRR puede facilitar la captación de los patógenos por las células o puede transmitir señales (como la activación de NF- $\kappa$ B) para activar la producción de citocinas y quimiocinas, funciones antimicrobianas, proinflamatorias o estimular a células T para inducir respuestas. Es importante remarcar la función de las CD como puente entre la inmunidad innata y la adaptativa, ya que ciertos subconjuntos de estas inducen la síntesis de IgA en las células B y funcionan como CPA para iniciar las respuestas dependientes de células T (Tezuda y Ohteki 2019)

### **1.2.2 Respuesta inmune adaptativa en mucosas**

Los linfocitos B se desarrollan en la médula ósea, donde producen sus receptores, esto proporciona la capacidad de conocimiento de antígeno. Las células B son muy importantes en la inmunidad de mucosas, especialmente como productoras de IgA secretora, el anticuerpo más abundante en ratones y humanos (Lockhart *et al.*, 2022). Las células B que migra a lámina propia, maduran para convertirse en células plasmáticas productoras de IgA (Whershil y Furuta., 2007). Las células plasmáticas (PC, del inglés, “plasma cells”) también llamadas células B efectoras, son productoras de anticuerpos, secretando miles de estas moléculas por segundo (Wang *et al.*, 2019). Las PC producen IgA secretora (SIgA) en forma dimerica, unidos por una cadena J, se ubican principalmente en la lámina propia, posteriormente se transportará a través de las barreras epiteliales después de unirse al receptor polimérico de inmunoglobulina (pIgR) ubicado en la cara basolateral de las células epiteliales. La liberación de IgA da lugar a IgA secretoras con especificidad para varios antígenos que se encuentran en los sitios inductivos de la mucosa (Fujihashi y Mc Ghee 2012). La IgA secretora actúa para evitar que los antígenos lumbinales, los microorganismos, proteínas extrañas, toxinas y microorganismos penetren la superficie de las mucosas (Whershil y Furuta., 2007)

Por otro lado, el procesamiento de los antígenos proteínicos por las CPA genera fragmentos por acción proteolítica, para producir péptidos que se unirán y serán presentados a las células T por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés “major

histocompatibility complex”), el cual consta de un conjunto de genes dispuestos dentro de un segmento de ADN en el cromosoma 6 en humanos y en el cromosoma 17 en ratones, estos codifican para proteínas de membrana las cuales desempeñan funciones en el reconocimiento intercelular y la diferencia entre lo propio y extraño (Kindt *et al.*, 2007)

Existen dos tipos principales de moléculas de MHC

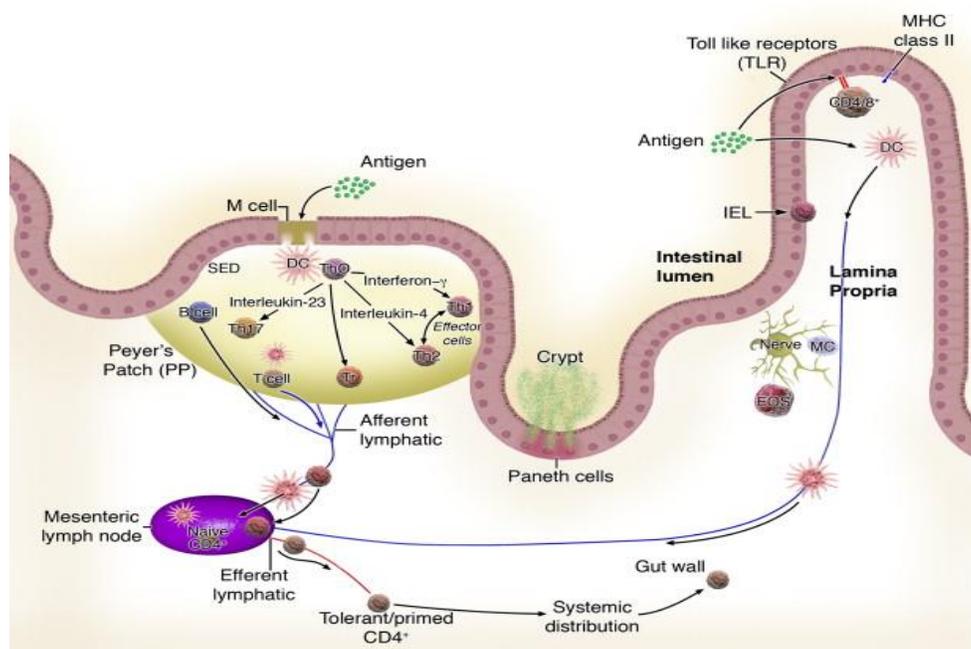
- a) **MHC clase I:** Proteínas de membrana presentes en la mayoría de las células nucleadas, se unen a péptidos derivados del citoplasma celular; su principal función es la presentación de antígenos peptídicos (8 a 10 aa) a células Tc (linfocito T citotóxico) (Abbas *et al.*, 2004), estos linfocitos expresan la molécula CD8 y reconocen y destruyen células anfitrionas infectadas por virus u otros microorganismos intracelulares (Kindt *et al.*, 2007)
  
- b) **MHC clase II:** Proteínas de membrana que se expresan principalmente en las CPA (macrófagos, CD y células B), se unen a péptidos (14 a 25 aa) derivados de proteínas extracelulares que se interiorizan en vesículas fagocíticas o endocíticas; presentan péptidos antigénicos a las células Th (linfocito T helper) (Abbas *et al.*, 2004), estos linfocitos expresan la molécula CD4 y tienen funciones efectoras que consisten en activar los macrófagos durante respuestas inmunitarias celulares y favorecer la producción de anticuerpos por los linfocitos B en respuestas humorales (Kindt *et al.*, 2007)

### 1.2.3 Anatomía de GALT

El tracto gastrointestinal se enfrenta diariamente a una carga antigénica enorme, ya que la cavidad oral es una puerta de entrada para microbios, alimentos y sustancias extrañas, las cuales pueden alterar la homeostasis, por lo cual la participación del sistema inmune inherente a la mucosa es indispensable para la protección de este entorno (Wu *et al.*, 2014). El sistema inmunitario de la mucosa asociado al tracto gastrointestinal o también llamado tejido linfoide asociado al intestino (GALT) es capaz de discriminar entre patógenos y

antígenos alimentarios, esta capacidad de mantener un estado de falta de respuesta es llamado “tolerancia oral” (Whershil y Furuta., 2007). El epitelio intestinal es el eje central de la inmunidad de las mucosas y es la segunda barrera física más extensa en el cuerpo humano, se estima que el intestino contiene aproximadamente el 70% de la población de linfocitos del cuerpo (Suárez *et al.*, 2021)

GALT cuenta con diversos tipos de células (estructurales e inmunitarias) con varias funciones, esto le otorga gran eficiencia como barrera física y química (Suárez *et al.*, 2021). Entre las células presentes en GALT se encuentran, células B, células T, células dendríticas, células M, células de Paneth y linfocitos intraepiteliales (Whershil y Furuta., 2007). Al igual que MALT, GALT se puede dividir en sitios inductores, constituidos por las placas de Peyer (PP), ganglios linfáticos mesentéricos (GLM, del inglés, “mesenteric lymph node”), folículos aislados más pequeños y sitios efectores, constituidos por linfocitos dispersos en el epitelio y lámina propia (LP) (Mowat., 2003)



**Figura 6.** Estructura de la mucosa gastrointestinal. Tomado de Whershil y Futura., 2008

A continuación, se describirán los principales componentes celulares y tejidos de GALT.

**PP:** Son agregados linfoides macroscópicos que se encuentran debajo de la mucosa a lo largo del intestino delgado. Están compuestas sobre todo por linfocitos B, son los sitios inductores de IgA más importantes (York y Marca, 2017) y en menor cantidad por linfocitos T (Abbas *et al.*, 2004) además de CD. Espacialmente, las PP están separadas de la luz intestinal por FAE y una capa de epitelio inmediatamente debajo conocida como cúpula subepitelial (SED, del inglés, “associated sub-epithelium dome”) (Mowat., 2003). Mediante un estado de exposición constante al antígeno, las PP exhiben una actividad de centro germinal (GC) que contribuyen a la producción de IgA específica de antígeno (Reboldi *et al.*, 2016), esto se lleva a cabo por la influencia de señales intracelulares de las CD, células T y la producción de citocinas como TGF- $\beta$  e IL-10 (Whershil y Furuta 2007)

**GLM:** Son los ganglios linfáticos más grandes del cuerpo, se distribuyen en la pared del intestino delgado y grueso, en conjunto con las PP funcionan como sitios para la interacción y activación de las células inmunitarias (Mowat, 2003). Las CD migran desde los tejidos intestinales hacia los MLN, donde presentan antígenos y controlan el desarrollo, migración y diferenciación funcional de las células del sistema inmune adaptativo (Houston *et al.*, 2015)

**LP:** Ubicada debajo del epitelio intestinal, contiene una población residente de linfocitos T CD4 y CD8, células plasmáticas, macrófagos, CD y eosinófilos (Berin y Chehade., 2010), participa tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adaptativa mediante la realización de varias respuestas efectoras (secreción de citocinas, IgA, quimicocinas, proteasas y hormonas) (Suárez *et al.*, 2021)

**Células linfoides innatas (ILCs, del inglés, “innate lymphoid cells”):** Grupo de linfocitos, su función une las respuestas innata y adaptativa en la inmunidad de las mucosas, son células de respuesta rápida y producen citocinas a pocas horas de su activación, regulan la homeostasis a través de interacciones con otras células estructurales y células del estroma en las barreras epiteliales intestinales. Son células residentes en los tejidos, sin embargo, también se pueden encontrar en la periferia (tejido pulmonar y piel). ILC también juegan un papel en el desarrollo prenatal de GALT, ya que después del nacimiento, estas células responden rápidamente a bacterias intestinales comensales y patógenas, parásitos y

componentes alimentarios mediante la producción de citocinas como IL-22, IL-17 o IL-13, contribuyendo así a la formación y función de GALT (Fan *et al.*, 2019)

**Células epiteliales intestinales:** (IEC, del inglés, “intestinal epithelial cells”). Constituyen la mayor parte de la barrera intestinal, proporcionan defensa adicional ante invasores microbianos, este epitelio contiene células especializadas, como las células de Paneth, células calciformes, células de goblet, células M y está protegido por una capa de moco, las IEC también transportan activamente IgA, secretados por las células plasmáticas en la mucosa (Fan *et al.*, 2019). Las IEC detectan microbios mediante la expresión de receptores innatos (Allaire *et al.*, 2018), producen citocinas y quimiocinas, así como hormonas que sirven como moduladores del S.I. y del sistema nervioso en el intestino (Goto, 2019). Las IEC también responden a factores producidos por las células inmunitarias, esto ayuda a regular la proliferación y diferenciación de estas (Kong y Zhang 2018)

**Células M(microfold):** Están ubicadas en el epitelio asociado al folículo (FAE, del inglés, “follicles associated epithelium”), se encargan de la captación de antígenos y transportarlos a través de su membrana basolateral por transcitosis, este proceso facilita la captación del antígeno por CD, macrófagos y células B para iniciar las respuestas inmunitaria, expresan receptores TLR y son capaces de producir citocinas y quimiocinas (Kobayashi *et al.*, 2019)

### **1.2.3.1 Linfocitos intraepiteliales intestinales (iIEL, del inglés, “intestinal intraepithelial lymphocytes”)**

Son un subconjunto de linfocitos de la mucosa, residen en el epitelio intestinal por encima de la membrana basal intercalada en las IEC (Whershil y Furuta 2007). En el epitelio del intestino delgado se estima que hay entre 25 y 50 millones de iIEL. Los iIEL conservan la integridad de la barrera intestinal al controlar la renovación y reparación del epitelio, intervienen en interacciones homeostáticas con la microbiota, nutrientes y en la defensa del huésped contra patógenos (Van y Olivares 2018; Cheroutre *et al.*, 2011). Los IEL se dividen en distintos grupos heterogéneos con diversas funciones, se han identificado dos grupos principales de linfocitos en función de su modo de selección en el timo y la expresión del receptor de células T (TCR, del inglés, “T-cell receptor”)  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  (Sheridan y Lefrancois, 2010). Estos subconjuntos de IEL están presentes tanto en humanos como en ratones

(Mayassi 2018). Dentro de las funciones que comparten todos los linajes de IEL se encuentra la actividad citolítica, pueden expresar citocinas como IL-12, IL-15 e IL-18 (las cuales actúan de forma autocrina conduciendo al mantenimiento, reclutamiento y activación de IEL) y citocinas efectoras como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-17 e IL-22 (Vandereyken *et al.*, 2020; Van y Olivares 2018)

**IEL convencionales;** También llamados IEL-a, inducidos o adaptativos, expresan el receptor de células T  $\alpha\beta$  (TCR  $\alpha\beta$ ) y los correceptores CD4 o CD8 $\alpha\beta$ , tienen un fenotipo efector de memoria (CD2<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD28<sup>+/-</sup>, CTLA4<sup>+/-</sup>, CD44<sup>+</sup>, LFA<sup>+</sup>) se desarrollan a partir de linfocitos dobles positivos (DP; CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) y están restringidos por el MHC clase I y II. (Qui y Yang, 2013). Estos linfocitos adquieren propiedades efectoras después del reconocimiento de antígenos extraños (su número es limitado en las primeras etapas de vida), la acumulación progresiva de IEL convencionales en el S.I de la mucosa permite el desarrollo de un repertorio inmunitario casi personalizado (Mc. Donad *et al.*, 2018; Cheroutre *et al.*, 2011). Después de la activación en los ganglios linfáticos o la LP migran al epitelio intestinal, una vez ahí protegerán la barrera de la mucosa, ya sea como células efectoras o como células T residentes (Van y Olivares, 2018)

**IEL no convencionales:** También llamados IEL-b, naturales o innato, expresan TCR $\alpha\beta$  o TCR  $\gamma\delta$ , expresan homodímeros de CD8 $\alpha\alpha$ , no expresan CD4, CD8, CD2 y CD5, varios IEL no convencionales coinciden con la expresión de moléculas expresadas por células NK como; CD16 y CD22, por último, expresan con frecuencia un complejo de CD3. Obtienen propiedades efectoras después de la estimulación por antígenos propios, por lo que están presentes desde el nacimiento y disminuyen con la edad (Mc. Donad *et al.*, 2018; Cheroutre *et al.*, 2011), se denominan de tipo innato por su capacidad de ser activados por citocinas y ligandos-receptores del eje innato de manera independiente del TCR. Estos IEL de tipo innato comprenden hasta el 80% de IEL murinos, en humanos representan del 5 al 30% (Vandereyken *et al.*, 2020). El subconjunto de IEL TCR  $\gamma\delta$  pueden producir citocinas proinflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , citocinas antiinflamatorias TGF- $\beta$  e IL-10, IL-13 y grazimas. Varios linfocitos no convencionales expresan marcadores de activación como CD44 y CD69,

a pesar de ello, estos linfocitos residen en el tejido y por consiguiente no recirculan (Van y Olivares, 2018)

### **1.2.3.2 Migración de los IEL hacia el intestino**

Las moléculas de adhesión, así como los compuestos quimio atrayentes de leucocitos, dirigen el tráfico de las células del sistema inmune. Combinaciones específicas de receptores dirigen a los IEL a sitios anatómicos particulares, el tráfico selectivo proporciona un mecanismo para segregar la respuesta inmunitaria y el conocimiento de estos mecanismos representa un objetivo para la manipulación de las respuestas inmunitarias. Las CD del tejido linfoide asociado a GALT metabolizan la vitamina A de los alimentos en ácido retinoico, lo que induce a las células T a expresar receptores de localización intestinales  $\alpha 4\beta 7$  y CCR9 y suprime la expresión de ligandos asociados a otras regiones (Parra *et al.*, 2014)

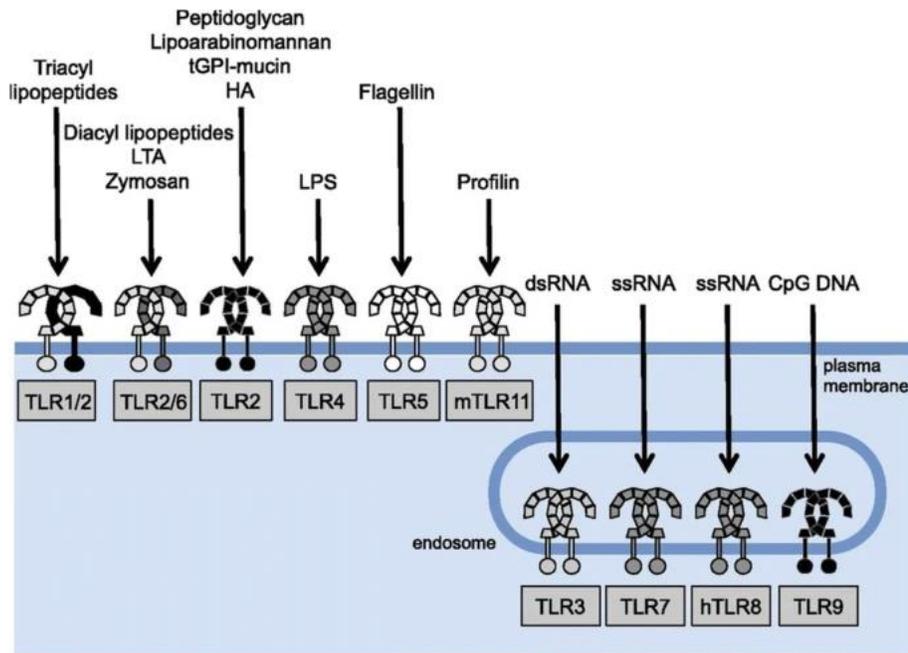
Para iniciar una respuesta inmune protectora contra rotavirus, los linfocitos IEL vírgenes migran a través del torrente sanguíneo mediante las vénulas endoteliales altas (VEA) asociadas a las PP, estas expresan MAdCAM-1, los IEL vírgenes expresan L-selectina (CD62L) la cual reconoce a MAdCAM-1, presentes en las vénulas, de esta manera se reclutan los linfocitos en la PP. Luego se da el reconocimiento de CCR7 de los IEL vírgenes con los receptores CCL21/CCL19 presentes en células de VEA, esto refuerza la adhesión al endotelio para después migrar hacia el interior de PP y GLM, donde entran en contacto con CD activadas que presentan los antígenos en contexto MHC II. Las células activadas por reconocimiento del antígeno inician el proceso de activación, proliferan, pierden la expresión de CD62L y aumenta la expresión de  $\alpha 4\beta 7$  y CCR9 (Mora *et al.*, 2008). Posteriormente, las IEL regresan al torrente sanguíneo por las vénulas eferentes, ahora estas células expresan un patrón de migración  $\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM-1 y CCR9/CCL25, así como receptores para residir en VEA (P/E selectina) (Mora *et al.*, 2008). En el momento que los linfocitos efectores retornan al intestino se encuentran con una población de CPA conformada por macrófagos, CD y células B. La interacción secundaria con el antígeno desencadena una respuesta más rápida y potente por parte de las IEL efectoras, la cual promueve la producción de diversas citocinas y promueve la expansión clonal de células T y B (Parra, 2014)

## **1.2.4 Respuesta inmune en GALT**

### **1.2.4.1 Respuesta inmune innata en GALT**

El epitelio está protegido por una capa de mucina, una glucoproteína secretada por las células calciformes, las proteínas de unión celular, como claudina, ocludina y ZO-1, determinan la permeabilidad de los solutos en las IEC. Los IEC participan en la respuesta inmune intestinal a través de la secreción de péptidos antimicrobianos, citocinas y quimiocinas (Ruth y Field, 2013). Ocasionalmente, los antígenos pueden infiltrarse en la barrera epitelial e invadir la mucosa, sin embargo, son detectados mediante sensores inmunológicos (Kinnebrew y Pamer 2012). Como se mencionó anteriormente, los receptores que participan en la respuesta innata contra patógenos son los PRR, activamente los TLR, RLR y NLR participan en la respuesta en GALT (Lockhart *et al.*, 2022)

Los TLR son receptores de glicoproteína transmembranales que estructuralmente cuentan con una región extracelular N-terminal que contiene múltiples repeticiones (de 20 a 27) ricas en leucina (LRR, del inglés, “leucine-rich repeat”), formando una estructura de herradura los cuales contienen motivos de glicanos que sirven de sitios de unión para los antígenos (Akira *et al.*, 2006), poseen también un dominio transmembrana y un dominio intracelular C-terminal, este último muestra similitud al receptor de interleucina-1 (IL-1R, del inglés, “intercellular-toll interleukin 1”), el cual media la señalización downstream posterior a la activación del receptor (Akira y Takeda, 2004; Bowie y O’Neill 2000; EI *et al.*, 2019). Los tipos de ligando para los TLR’s varían entre ácidos nucleicos hidrofílicos, lípidos hidrofobos, compuestos pequeños y macromoléculas (Wang *et al.*, 2015). Se conocen 10 tipos de TLR en humanos y 13 miembros en ratón (Yamamoto y Takeda 2010). Las principales propiedades que diferencian a los TLR, son la localización subcelular, el ligando que reconocen y las vías de transducción de señales (Singh *et al.*, 2014)



**Figura 7.** Ligandos que activan a los TLR's. Tomado de El *et al.*, 2019

Los receptores similares a RIG-I o RLR (del inglés, “RIG-I like receptors”), son sensores citosólicos que se expresan de manera ubicua en todos los tipos de células para reconocer ARN viral, (Liu *et al.*, 2017), esta familia de proteínas abarca 3 miembros: el gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I, del inglés, “retinoic acid-inducible gene I”), la proteína asociada a la diferenciación de melanoma 5 (MDA5, del inglés, “melanoma differentiation-associated protein 5”) y la proteína LGP2 (del inglés, “Laboratory of Genetics and Physiology 2”) (Rhewinkel y Gack 2020), todos los RLR cuentan con un dominio CTD (del inglés, “carboxy-terminal”) que toma parte en el reconocimiento del ARN y un dominio helicasa central DECH-box que intervienen en la hidrólisis de ATP. RIG y MDA5 cuentan con un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD, del inglés, “caspase activation and recruitment domain”), LGP2 carece del dominio CARD. Una vez activados estos sensores, las cascadas de señalización conducen a la inducción de la transcripción de genes que codifican para IFN I y otros genes inmunitarios (Suárez y Buelvas 2015)

En cuanto a los receptores NOD o receptores similares a NOD (NLR, del inglés, “NOD-like receptors”), son proteínas citosólicas que regulan las respuestas inflamatorias y apoptóticas, tienen importancia también en la defensa antiviral. Los NLR contienen un dominio C-terminal, LRR, que sirve como región de unión al ligando, un dominio central NATCH, el cual media la activación y oligomerización, y un dominio N-terminal responsable de la señalización downstream, el cual puede consistir en CARD o un dominio de pirina (PYD, del inglés, “pyrin domain”) (Fritz *et al.*, 2006)

Las CD expresan un repertorio diverso de TLR en la mucosa intestinal, la activación de las CD estimula la secreción de citocinas y quimiocinas e induce la migración de las CD a los ganglios mesentéricos donde generan respuestas de IgA específicas. Los neutrófilos cumplen la función temprana de defensa al fagocitar microbios y producir factores microbicidas en respuesta a la detección de moléculas microbianas a través de TLR o NOD (Kinnebrew y Pamer 2012). Los macrófagos destruyen eficazmente los microorganismos fagocitados mediante la generación de superóxido y óxido nítrico, sin necesidad de la secreción de citocinas proinflamatorias, con lo cual se mantienen con niveles mínimos de inflamación. Una adaptación funcional adicional es la deficiencia de receptores RRP, por lo cual en LP los macrófagos no responden a LPS y otros patrones moleculares (Schenk, 2007)

#### **1.2.4.1.1 Citocinas en respuesta inmune en GALT**

Las citocinas (del griego cito-, “célula”, y kinein, “moverse”) son un conjunto de proteínas de bajo peso molecular (<40 kDa) que participan en la comunicación celular, mediante la unión a receptores ubicados en la membrana celular, pueden ejercer su acción autocrina, paracrina o endocrina, las citocinas son secretadas por casi todas las células en respuesta a diversos estímulos, para regular e influir en la respuesta inmune (Kindt *et al.*, 2007). Estructuralmente, las citocinas se pueden clasificar en grupos o familias, lo cual no necesariamente describe genes comunes, si no estructuras similares, las principales familias son; eritropoyetina, interferón, quimiocina y factor de necrosis tumoral (TNF). El término “citocina” abarca los interferones, interleucinas, la familia de quimiocinas, factores de crecimiento y adipocinas. También pueden dividirse en clases funcionales como factores de

crecimiento de linfocitos, otras funcionan como moléculas proinflamatorias o antiinflamatorias, algunas polarizan la respuesta contra el antígeno o pueden funcionar como factores de transcripción (Dinarello, 2007). La concentración en la que actúan las citocinas puede variar, por ejemplo, citocinas con acción endocrina circulan en concentraciones picomolares, pero ante una fuerte activación inmune pueden aumentar hasta 1000 veces (citocinemia) (García *et al.*, 2013).

La importancia de las citocinas en el tracto gastrointestinal radica en el mantenimiento de la homeostasis, las citocinas pueden afectar positiva o negativamente la integridad de la barrera epitelial intestinal al influir en la proliferación, apoptosis y permeabilidad celular. La comunicación entre las células epiteliales y las células inmunes de la mucosa es crucial para coordinar las respuestas apropiadas, ya sea a través del contacto célula a célula o por la liberación/ reconocimiento de factores solubles (Andrews *et al.*, 2018). Las principales citocinas que participan en GALT se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Principales citocinas en la salud y patogenia del intestino (Tomado de Mahapatro <i>et al.</i> , 2021)			
CITOCINA	FUENTE(S) CELULAR (ES)	CÉLULA(S) BLANCO	FUNCIÓN
<b>IL-22</b>	ILC, Th22, NK, Th1, Th17, T CD8+, células T $\gamma\delta$	IECs	Activación y señalización STAT3 y liberación de AMP
<b>IL-2</b>	Células T	Th1, Tregs	Activación y liberación de STAT3/5, diferenciación de células T, homeostasis intestinal
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	ILC1, macrófagos	IECs, CD, Tregs	Protección contra patógenos, activación y señalización de STAT1, ruptura de la barrera epitelial
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	IECs, CD, Treg, mast cells	Células B, Th9, Macrófagos	Expansión de células Tregs, secreción de IgA, desarrollo de IEL, mantenimiento de uniones estrechas
<b>IL-4</b>	ILC2, Th2	IECs, mast cells	Diferenciación de IEC a células secretoras, protección contra parásitos intestinales, activación de señalización de STAT6
<b>IL-10</b>	Macrófagos, Tregs	IECs	Homeostasis intestinal, proliferación de IEC
<b>IL-17A</b>	Th1, ILC3	IECs	Respuesta antimicrobiana, mantenimiento de la homeostasis
<b>IL-7</b>	IECs	ILC3, Tregs, células T efectoras	Secreción de citocinas proinflamatorias, homeostasis de IEC

<b>IL-18</b>	IECs	Th17, Tregs	Proliferación de IEC, regeneración tisular, producción de citocinas proinflamatorias
<b>IL-23</b>	IECs, fibroblastos, macrófagos	IELs, ILS3, NK, células T	Secreción de citocinas proinflamatorias, contribuye a la inflamación crónica
<b>TNF</b>	ILC1, macrófagos	IECs	Muerte de células epiteliales, migración de células epiteliales durante cicatrización y heridas, reparación de mucosa durante la inflamación
<b>IL-25</b>	IECs	ILC2, células T	Protección del huésped frente a helmintos intestinales, respuesta inmunitaria tipo II
<b>GM-CSF</b>	Células T, ILC3	Monolitos, macrófagos, Tregs	Diferenciación de macrófagos, secreción de IgA por células B, aclaramiento bacteriano, reparación epitelial en cicatrización de heridas
<b>IL-6</b>	IECs, fibroblastos, Macrófagos	Th17, IELs, IECs	Proliferación y reparación de IEC, activación de STAT3, homeostasis de criptas
<b>IL-5</b>	ILC2, Th2, células B	IECs, células B, eosinófilos	Diferenciación de IECs a células secretoras, confiere protección contra infección por parásitos intestinales
<b>IL-9</b>	ILC2, Th9	IECs	Diferenciación de IECs a células secretoras, filtraciones en la barrera intestinal
<b>IL-13</b>	ILC2, Th2	IECs	Diferenciación de IEC a células secretoras, producción de mucina, protección contra parásitos intestinales, activación de señalización de STAT6
<b>TSLP</b>	IECs, mast cell, CD	Th2, ILC2	Respuesta inmune tipo II, activación de células B y T
<b>IL-33</b>	IECs, miofibroblastos intestinales	ILC2, Tregs, Th2, IEC	Respuesta inmune tipo II, diferenciación de IEC, inflamación intestinal
<b>IL-11</b>	Macrófagos	IECs malignos	Activación de señalización JAK/STAT, supervivencia de células tumorales
<b>IL-15</b>	IECs	Células T, IELs	Alteración de la barrera epitelial, funciones antitumorales
<b>OMS</b>	Células T, CD	Células estroma	Secreción de citocinas proinflamatorias, activación de la señalización JAK/STAT
<b>Areg</b>	ILC2, células T	IECs	Reparación de tejido después de daño, fibrosis
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	IECs	Macrófagos, Células endoteliales	Activación de células T y ILC
<b>IL-12</b>	Monocitos, macrófagos, CD	Th1	Supervivencia y diferenciación de células T, proliferación de células NK

#### 1.2.4.2 Respuesta inmune adaptativa en GALT

Una línea de defensa adaptativa clave es constituida por las inmunoglobulinas, debido a la gran carga antigénica en esta región, se justifica la considerable producción de IgA secretora. Más del 80% de las células plasmáticas humanas (CP) y de ratón, se encuentran en el intestino y alrededor de 80-90% de ellas producen IgA. Las CD que se han diferenciado inducen la generación de células plasmáticas (Schenk.,2007), estas expresan la enzima retinaldeído deshidrogenasa que cataliza la producción de ácido retinoico, el cual induce la unión de  $\alpha 4\beta 7$  a su receptor de unión CCR9, secretan también la proteína inductora de IgA (IGIP, del inglés, “IgA-inducing protein”) y APRIL (del inglés, “A proliferation-inducing ligand”) que, en conjunto con la citocina TGF- $\beta$ , respaldan la recombinación del cambio de clase de IgA, después de la expansión clonal, la hipermutación y la selección de los centros germinales en las PP o ganglios linfáticos, los plasmoblastos regresan a la LP donde se diferencian en CP. La IgA intestinal humana es principalmente dimérica y se compone de los subtipos IgA1 e IgA2, esta última tiene una bisagra más corta que IgA1 y por o tanto, es menos susceptible a proteasas bacterianas, lo cual justifica que las CP del intestino delgado secreten más IgA1 y la concentración de IgA2 aumente desde el duodeno, íleon y colon (Spencer y Sollid 2016)

En cuanto a las células T en la mucosa del intestino, se dividen en 2 tipos, un tipo expresa receptores de células T  $\alpha:\beta$  convencionales ( $CD8^+$  y  $CD4^+$ ), que participan en respuesta a antígenos extraños, el segundo tipo está formado por células T con fenotipos inusuales TCR  $\gamma:\delta$ , las células T que expresan este receptor, son abundantes en la mucosa intestinal a diferencia de otros tejidos, los receptores de estas células, no se unen a los ligandos peptídicos del MHC normal, se unen a ligandos diferentes como el MHC clase IB (no polimórficas), a contrario de las células T convencionales, varias de estas células no pasan por selección negativa y positiva en el timo (Janeway *et al.*, 2001). Algunas células T  $CD8^+$  y  $CD4^+$  que se localizan en la LP, cuentan con un fenotipo de memoria dado por la expresión selectiva de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  y CCR9, las células T  $CD4^+$  en LP producen citocinas como IL-4, IL-10 e INF- $\gamma$  (Whershil y Futura., 2008). De igual modo, las células T  $CD4^+$  participan en la tolerancia oral, principalmente en la mucosa intestinal, las cuales se dividen en tres subtipos; células T-helper 3 (Th3), T reguladoras 1 (Tr1) y células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Berin y Chehade., 2010)

### **1.2.5 Respuesta inmune contra Rotavirus**

Diversos virus entéricos como los adenovirus, norovirus, astrovirus, sapovirus y rotavirus causan infección intestinal mediante la inflamación tisular, alterando la barrera epitelial, provocando así malabsorción y diarrea (Bányai *et al.*, 2018). La respuesta inmunológica ante tales daños ocurre principalmente dentro de la mucosa intestinal, la cual contiene una capa de células epiteliales. Las células epiteliales intestinales son los principales objetivos de la infección por rotavirus y el virus infecta solo las células epiteliales de las vellosidades maduras ubicadas en el intestino delgado (Holloway y Coulson 2013)

#### **1.2.5.1 Respuesta inmune innata contra RV**

Una vez que el virus ha internalizado en el huésped, su detección tiene lugar a través de reconocimiento de patrones, ya sea intrínsecamente, por una célula infectada o por el reconocimiento de ácidos nucleicos citosólicos o extrínsecamente mediante el reconocimiento de ácidos nucleicos endosómicos (Lockhart *et al.*, 2022)

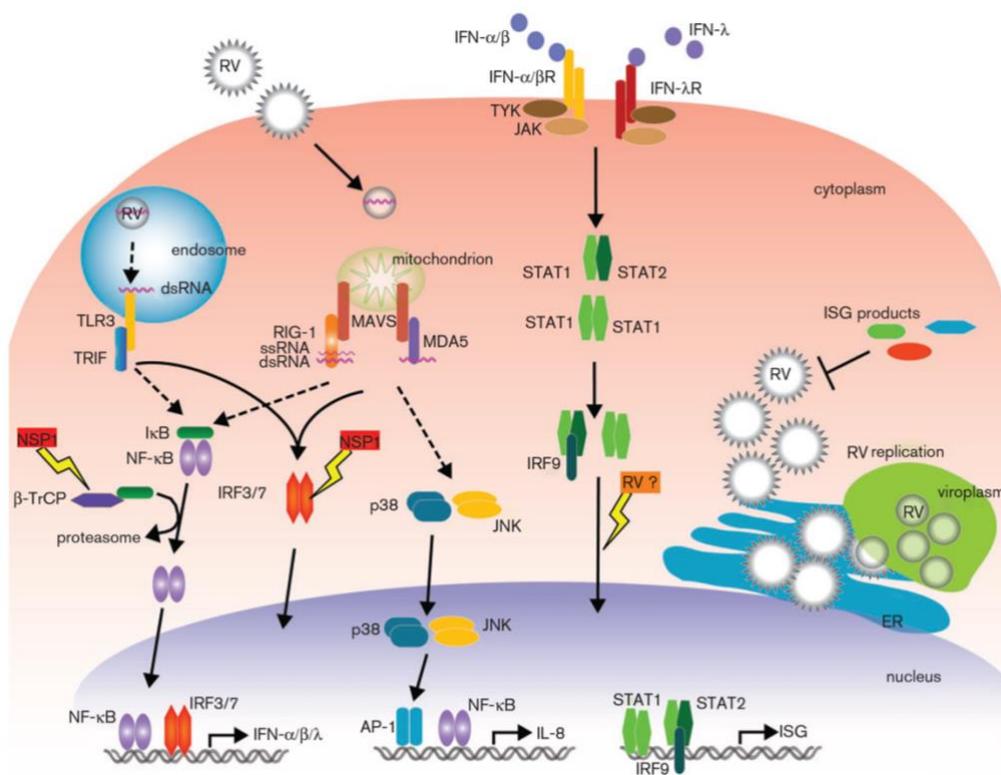
Los receptores similares a RIG-I o RLR que participan en la respuesta inmune innata contra el rotavirus son, principalmente, RIG-I y MDA5, RIG puede detectar RNA (ssRNA/dsRNA) de longitud corta a media (de 21b a 1 kb) mientras que MDA5 reconoce dsRNA largo (al menos 2 kb) (Kato *et al.*, 2008). Se reconocen ARN asociados a virus, ya que, se diferencian de los propios (mRNA o tRNA), por tener un 5'-trifosfato expuesto (Daffis *et al.*, 2010). Tras la detección de rotavirus, se recluta a la proteína adaptadora de señalización antiviral mitocondrial (MAVS, del inglés, mitochondrial antiviral) también conocida como IPS-1, VISA o Cardif (Shet *et al.*, 2005), la incorporación de MAVS desencadena una cascada de señalización que termina con la activación del factor regulador de interferón (IRF, del inglés, “interferon-regulating factor”) 3 e IRF7 y NF- $\kappa$ B. Estos factores de transcripción inducen los interferones I y III, citocinas y quimiocinas de la respuesta inmune (Besch *et al.*, 2009)

La detección endosómica se lleva a cabo mediante TLR, específicamente TLR3 reconoce dsARN, TLR3 se localizan en el compartimento intracelular de macrófagos, linfocitos B, CD maduras y se encuentran tanto intracelularmente como en la superficie de células NK, células

epiteliales y fibroblastos, está ausente en los neutrófilos, que disponen de otros sensores para detectar dsRNA (Jensen y Thomsen 2012; Vercammen *et al.*, 2008). A diferencia de RIG-I y MDA5, TLR3 difiere en la localización celular, especificidad con el ligando y las vías de señalización downstream, lo cual dota de una vía alterna para de detección contra rotavirus. El dsRNA es el ligando por excelencia para TLR3, sin embargo, también puede ser activado por ARN monocatenario (formando estructuras secundarias) del huésped o puede ser activado por ligandos sintéticos como el ácido polirribonucleico: polirribocitidílico [poli(I:C)], es un análogo de dsRNA que se usa con frecuencia para imitar la infección viral en estudios sobre la función y señalización de TLR3 (Dunlevy *et al.*, 2010). Estructuralmente, TL3 contiene, como todos los miembros de TLR, un dominio extracelular, una región transmembranal y un dominio citoplasmático que incluye un dominio TIR conservado (Vercammen *et al.*, 2008). La señalización downstream de TLR3 posterior al reconocimiento de dsRNA de rotavirus, inicia con la formación de un dímero de TLR3, ambos dominios TIR provocan el reclutamiento del dominio TIR que contiene el adaptador que induce IFN- $\beta$  (TRIF), esto conduce a la activación del factor regulador de interferón 3 (IRF3) e IRF7, los cuales resultan en la activación de IFN. TRIF activa también otros factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y la proteína activadora 1 (AP-1) (Holloway y Coulson 2013)

Posterior a la detección viral se activa la producción de factores de transcripción como IRF3/7 responsables de la inducción de IFN. Los INF representan una familia de citocinas que se clasifican en: tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ), tipo II (IFN- $\gamma$ ) y tipo III (IFN- $\lambda$ ), también existen varios subtipos que se clasifican en función de su estabilidad a pH bajo (Dowling y Forero, 2022). IFN-  $\gamma$  es producido por leucocitos y participa en respuesta ante infecciones microbianas, por otro lado, IFN- $\alpha/\beta$  es producido en todos los tipos de células y tienen capacidad de restringir infecciones virales (Burke *et al.*, 2019). IFN I y III son de gran relevancia en la infección por rotavirus, ya que sus funciones están bien estudiadas en el tracto gastrointestinal, donde los IFN III actúan casi exclusivamente en las células epiteliales e IFN I actúa sobre las células inmunes de la lámina propia (Kotenko *et al.*, 2019). La activación de IRF3 e IRF7 es el responsable primordial de la inducción de IFN I y III, posterior a la producción de estos por las células infectadas, el IFN  $\alpha/\beta$  e IFN- $\lambda$  se unen a sus receptores específicos IFN- $\alpha/\beta$ R e IFN- $\lambda$ R respectivamente. IFN- $\alpha/\beta$ R también conocido como IFNAR (compuesto por las

subunidades IFNR1 e IFNR2), se expresa de manera ubicua, mientras que IFN- $\lambda$ R se expresa principalmente en células epiteliales (Donnelly y Kotenko, 2010). La unión a sus receptores induce una cascada de señalización que activa las quinasas JAK y TYK para posteriormente fosforilar a STAT1 y STAT2. Los heterodímeros de STAT1/2 se unen a IRF9 para formar un complejo transcripcional llamado ISGF3 que se transloca al núcleo y se une a los elementos de respuesta estimulados por interferón (ISRE's, del inglés, "interferon-stimulated response elements") ubicados en los genes estimulados por interferón (ISG, del inglés, "interferon-stimulated gene") (Holloway y Coulson 2013; Dowling y Forero, 2022). En respuesta a la producción de IFN, rotavirus produce la proteína NSP1, para impedir la respuesta del huésped y así, asegurar su replicación. NSP1 interfiere con la señalización de IFN, mediante la degradación de IRF3, IRF5 e IRF7 (Amimo *et al.*, 2021). NSP1 inhibe la vía de NF- $\kappa$ B, mediante la degradación de la proteína  $\beta$ -TrCP (del inglés, "( $\beta$ -transducin repeat containing protein"), la cual es necesaria para la degradación del inhibidor  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), que mantiene inactivo a NF- $\kappa$ B (Di Fiore *et al.*, 2015; Graff *et al.*, 2009)(Figura 8)



**Figura 8.** Mecanismos de acción que activan IFN ante la infección por Rotavirus. Tomado de Holloway y Coulson 2013

### **1.2.5.1.1 Citocinas inducidas ante la infección por RV**

Adicional a la producción de IFN's, la respuesta innata en las células infectadas por rotavirus se caracteriza por la producción de numerosas citocinas, la función de las citocinas es atraer mediante quimiotaxis a las células inmunitarias y que realicen sus funciones efectoras (Bartee *et al.*, 2009). La expresión de esas citocinas depende en gran medida del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual se activa luego de la detección del virus dentro de la célula. Una de las principales citocinas producidas ante respuesta a rotavirus es IL-8, se ha demostrado que es un eficiente atractor de neutrófilos. La producción de IL-8 está dada por NF- $\kappa$ B, sin embargo, otras citocinas como RANTES, GM-CSF, GRO- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e IP-10 dependen en menor medida de NF- $\kappa$ B para ser inducidas en IEC e intestino en ratones después de ser infectados por rotavirus (Holloway y Coulson 2013). NF- $\kappa$ B es de gran importancia en la inducción de múltiples citocinas, también interviene en la inhibición de la apoptosis y media la proliferación de las células epiteliales, mediante la activación de NF- $\kappa$ B se puede impedir la inducción de apoptosis en las células, esto sirve como una estrategia de evasión inmune viral, para asegurar la supervivencia de RV, también se ha reportado que en etapas iniciales de la infección, RV inhibe temporalmente la activación de NF- $\kappa$ B para retrasar la activación de la respuesta inmune innata (Amimo *et al.*, 2021). NF- $\kappa$ B también es importante para la inducción de IFN- $\beta$  e IFN- $\lambda$  (Graff *et al.*, 2009). La activación de vías como TLR3, RIG-I y MDA5 desencadena la producción de IL-6, IL-15, IP-10, las cuales inducen reclutamiento y activación de macrófagos y células NK y estimular respuestas inmunes adaptativas (Sen *et al.*, 2012). Se ha planteado que la acción combinada de citocinas, como IL-18 e IL-22 o IFN y IL-22, pueden mediar la eliminación de rotavirus en ratones (Crawford *et al.*, 2012)

### **1.2.5.2 Respuesta inmune adaptativa contra RV**

La infección por rotavirus induce el reclutamiento y activación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y una fuerte respuesta por parte de IgA (Rollo *et al.*, 2000). La IgA se encuentra entre los indicadores de protección principales contra la infección viral entérica, dado que puede neutralizarlo en la capa mucosa, antes de su llegada a las células huésped (Atmar *et al.*, 2011). Los anticuerpos circulantes tienen menos acceso a la mucosa y, por lo tanto, no tienen la capacidad de actuar en las fases iniciales de la infección (Zeng *et al.*, 2016). En varios casos,

los títulos de anticuerpos se correlacionan con la protección contra el virus (Velazquez *et al.*, 2000). Las células plasmáticas específicas para de rotavirus se pueden encontrar en la lámina propia y medula ósea de ratones 9 meses después de la infección. Esto es evidencia de que, a pesar del corto tiempo de acción de IgA, las células plasmáticas de larga duración pueden mantener una respuesta humoral tras la reinfección (Youngman *et al.*,2016). Estudios han demostrado que la protección contra reinfección, también se puede dar en ausencia de IgA, siendo modulada por IgG o IgM (O' Neal *et al.*, 2000). Los mecanismos de acción contra rotavirus en ratones, se ha logrado en estudios de ratones knockout (KO), eliminando la producción de células B o T y observando la dependencia de estas para resolver la infección.

Las células T CD4+ son esenciales para el desarrollo de más del 90% de IgA, en estudios realizados en ratones neonatos (Knipping *et al.*, 2011). Por otro lado, los experimentos de transferencia pasiva de células T CD8+ previenen de la infección a ratones neonatos y elimina la infección en ratones adultos y KO Rag2. (Van *et al.*, 2001). La respuesta de células T CD8+ es de las principales defensas contra infecciones virales, esto se ha correlacionado con la expresión de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  (así como su ligando MadCAM-1), la cual desempeñan un papel importante en el alojamiento de linfocitos activados en las PP y LP (Kuklin *et al.*, 2000). Además de diversos estudios que reportan la acción conjunta de células T CD8+, CD4+ y linfocitos B para la resolución de la infección contra rotavirus (Franco *et al.*,1997; Du *et al.*, 2016)

### **1.2.6 Vacunas contra Rotavirus**

Estudios longitudinales demuestran que las infecciones por rotavirus adquiridas naturalmente brindan protección contra la enfermedad tras la reinfección, la transmisión transplacentaria de anticuerpos protege al recién nacido y como se ha mencionado, el modelo de ratón ha sido clave para investigar los mecanismos por de protección (Ward *et al.*,2003). El objetivo para el desarrollo de una vacuna contra rotavirus es duplicar la protección contra la enfermedad, que se ofrece en la infección de manera natural, así como prevenir la mortalidad y hospitalizaciones por gastroenteritis grave. El desarrollo de diversas vacunas ha disminuido la cantidad de niños ingresados al hospital y el avance de la enfermedad a grave, sin embargo,

en los países de escasos recursos, donde la mortalidad asociada a rotavirus aún es alta, se requiere la implementación de nuevas vacunas más eficaces (Dennehy *et al* 2008)

La investigación para desarrollar una vacuna segura y eficaz contra rotavirus comenzó en la década de 1970, como los rotavirus humanos no se podían cultivar en tejidos, hasta varios años después, se utilizaron cepas de animales vivos atenuados para humanos, podrían imitar la respuesta inmune natural. La primera vacuna desarrollada incluía la cepa de rotavirus bovino NCDV (del inglés, “Nebraska Calf Diarrhea Virus”), siendo una sola dosis oral (Vesikari 2012), sin embargo, su eficacia fue variable y los resultados no prometedores en países en vías de desarrollo (Hanlon *et al.*, 1987). La inconsistencia sobre la protección de vacunas animales monovalentes, provocó que estas fueran descartadas, posteriormente se comenzaron a utilizar cepas de rotavirus humano, estas portaban genes de la proteína VP7, con 10 genes de rotavirus animal. La próxima generación de vacunas se formuló para añadir más de un serotipo y ofrecer una respuesta heterotípica como homotípica.

RotaShield: vacuna recombinante oral viva (tetraivalente basada en el rotavirus de simio RRV) administrada en tres dosis, conformada por una mezcla de cuatro cepas de virus rhesus-humano, G1 a G4 (Dennehy *et al* 2008). La vacuna fue autorizada en 1998 en Estados Unidos, sin embargo, después de la inmunización, en más de 600 000 lactantes, se informaron casos de intususcepción asociada a la vacuna a 9 meses de iniciado el programa de aplicación (Kramarz *et al.*, 2001). Como consecuencia de este efecto adverso, RotaShield fue retirada del mercado, la vacuna no se evaluó en países de bajos recursos como África, ya que los ensayos se detuvieron.

Rotarix (Glaxo Smith Kline Biologicals): Es una vacuna viva atenuada, el rotavirus presente en Rotarix se derivó de la cepa humana Wa 89-12 P1A [8]G1 (Angel *et al.*, 2007). La vacuna se administra en dos dosis orales a los 2 y 4 meses de edad. Los ensayos de esta vacuna fueron realizados en Finlandia y Estados Unidos, los primeros resultados multinacionales e informaron en México, Brasil y Venezuela, donde la eficacia contra enfermedad grave contra RV fue de 86 % (Grimwood *et al.*, 2010). Durante un periodo de 31 días después de cada dosis, no hubo un aumento en la intususcepción intestinal entre los receptores de la vacuna

en comparación con el placebo. Rotarix fue autorizada por primera vez en México y República Dominicana en 2004. La administración de la vacuna se recomienda a partir de las 6 semanas de edad (Vesikari *et al.*, 2009)

RotaTeq (RV5, Merck Research): Esta vacuna se compone de cinco cepas de rotavirus reagrupadas, cada una derivada de una cepa bovina WC3 parental, esta cepa se reclasificó con las proteínas de superficie VP7 de los rotavirus humanos G1, G2, G3 y G4, y del rotavirus bovino y VP4 humana tipo P [8] (Vesikari, 2012). RotaTeq se administra en tres dosis orales a intervalos de 1 a 2 meses a partir de las 6 a 12 semanas de edad. Ensayos realizados en Europa y Estados Unidos, comprobaron su eficacia (Vesikari, 2006), se analizó el riesgo de intususcepción dentro de los 42 días después de la primera dosis dentro de la fase III, los resultados sugirieron un riesgo menor. Su respuesta ante anticuerpos neutralizantes específicos es baja, por lo tanto, no se consideran responsables de la eficacia de esta vacuna (Block *et al.*, 2007). En cambio, varios serotipos desarrollan protección cruzada. RotaTeq se autorizó en 2006 por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés, “Food and Drug Administration”) (Dennehy *et al.*, 2008)

A pesar del éxito de las actuales vacunas contra rotavirus, aún es necesario entender más a fondo la inmunidad protectora natural y la inmunidad inducida por las vacunas, esto ayudará con el desarrollo de futuras vacunas, mejorando la eficacia e inmunogenicidad. Es necesario también implementar sistemas de vigilancia para identificar la carga de enfermedad por regiones, temporadas y la diversidad de las cepas (Grimwood *et al.*, 2012)

#### **1.2.6.1 Introducción de vacunas contra RV en México**

En la actualidad en México, la enfermedad diarreica aguda (EDA) de origen viral es más común que la de origen bacteriano o parasitario (Esparza *et al.*, 2009). Las infecciones gastrointestinales siguen siendo la segunda causa de morbilidad y es la quinta causa de muerte en niños de uno a cuatro años (INEGI, 2017). En países con mortalidad infantil elevada, rotavirus es la principal causa de muertes relacionadas con la diarrea en niños menores de cinco años (Xochihua *et al.*, 2019). En América Latina se registraron 1,259 muertes en niños menores de cinco años debido al rotavirus, además de 21,138,621 millones

de casos de diarrea, lo que representa una incidencia de 447, por 100,000 habitantes y una tasa de mortalidad de 2.5 por 100,000 habitantes (Troeger *et al.*, 2018). Durante el año 2016 en México, la tasa de mortalidad por rotavirus se calculó entre el 2 y 4.9 por 100,000 habitantes. De acuerdo con el Boletín Epidemiológico de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, para la semana 30 del 2019 se presentaron 802 casos (Boletín epidemiológico-DGE, 2019)

La incidencia máxima de los episodios graves ocurre de forma más temprana en los países de mortalidad alta que en los de mortalidad baja. En un estudio realizado en México, 42% de niños que fueron seguidos desde su nacimiento, tuvieron tres o más infecciones a la edad de dos años. Sin embargo, la inmunidad aumenta progresivamente con cada infección posterior y la sintomatología es más leve o puede presentarse una infección asintomática. Los adultos pueden infectarse con rotavirus y generalmente experimentan una forma subclínica o leve de la enfermedad. En los países templados, las infecciones muestran un patrón estacional, alcanzando su punto máximo durante el invierno. Por otro lado, en los países tropicales, las infecciones ocurren durante todo el año (Xochichua *et al.*, 2019)

En México se suelen identificar con frecuencia los serotipos G1, G3, G2, G4 y G9, y P1 y P2, en orden de frecuencia (Padilla *et al.*, 1998). Se ha confirmado que en este país la infección por rotavirus ocurre durante todo el año, aunque con mayor incidencia en invierno, especialmente en niños menores de 24 meses de edad, mientras la mortalidad infantil por diarrea ha disminuido en verano, persisten picos de mortalidad por esta causa en invierno (Parashar *et al.*, 2006)

En enero de 2004 en México se autorizó el uso de la vacuna monovalente de rotavirus humano atenuado (VRH) (Rotarix, GlaxoSmithKline), su venta inicio en enero de 2005 (Braine., 2005). Posteriormente, en febrero de 2006, la Secretaría de Salud incorporó en una primera fase la vacuna contra el rotavirus al programa nacional de inmunización para prevenir 1 000 muertes anuales; en esta fase se inmunizó, con 157 000 dosis (primera y segunda dosis), a los menores de seis meses en 20 503 localidades de 489 municipios con población indígena mayoritaria de los estados de Chiapas, Campeche, Durango, Chihuahua, Hidalgo, Guerrero, Nayarit, Jalisco, Puebla, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí,

Veracruz y Yucatán, y en mayo de 2007 se universalizó su aplicación en todo el país. Al finalizar el primer año de vacunación universal, en abril de 2008, se habían administrado un total de 723 663 dosis de la vacuna. Se estima que, en México, antes de la introducción de la vacuna contra el rotavirus, la incidencia de infección por rotavirus era de un episodio por lactante por año y la de diarrea vinculada con rotavirus de 0.3 episodios por lactante por año (Esparza *et al.*, 2009)

## 2. Antecedentes

### 2.1 VP6 como candidato a vacuna contra rotavirus

Dada la baja eficacia de las vacunas Rotarix y RotaTeq en países de bajos ingresos (40-60%) (Jiang *et al.*, 2010), aunado a la posibilidad del surgimiento de nuevas cepas con nuevos serotipos que no cubran las vacunas actuales, es importante desarrollar nuevas vacunas que induzcan una eficiente inmunidad heterotípica. En este sentido, VP6 es un excelente candidato de vacuna de nueva generación, ya que esta proteína es la más abundante y conservada de rotavirus, además de tener la propiedad de generar estructuras nanométricas autoensambladas como trímeros, tubos, esferas y partículas similares a virus (VLP, del inglés, “virus-like particles”), cuando se expresa en condiciones apropiadas. Todas estas características contribuyen a que VP6 sea una proteína altamente inmunogénica tanto para células T como células B (Ward y McNeal, 2010)

De esta manera, estudios previos han demostrado que VP6 puede inducir protección frente a la infección por RV administrada por vía parenteral como vacuna de ADN (Lopez *et al.*, 2018), proteína purificada (Pastor *et al.*, 2014; Tamminen *et al.*, 2013) o dirigida a células dendríticas mediante mAb (Badillo *et al.*, 2015), en presencia o ausencia de adyuvante. Además, cuando se inocularon ratones por vía intranasal (i.n.) con VP6 en presencia de un adyuvante, se indujo una protección superior al 90% contra la infección (Choi *et al.*, 2000). Todos los estudios apuntan a las células T como las principales células efectoras protectoras.

Interesantemente, un estudio realizado por Choi *et al.*, 2000, demostró que péptidos sintéticos yuxtapuestos, que cubrían a la secuencia completa de VP6, inoculados intranasalmente en presencia de toxina de cólera o la toxina LT de *E. coli* como adyuvantes, indujeron niveles de protección contra la infección por rotavirus a nivel intestinal de hasta un 98%. El péptido sintético 289-302 (RLSFQLVRPPNMTP), derivado de VP6, fue una de las mejores secuencias induciendo protección. Esta secuencia representa un epítipo de células Th restringido por la molécula del MHC clase II I-E<sup>d</sup>, reportado por primera vez en nuestro laboratorio (Baños *et al.*, 1997). Aunque la protección inducida fue dependiente de células Th, los mecanismos específicos no han sido dilucidados. Es posible que las células Th puedan

potenciar la respuesta de las células Tc primarias específicas para VP6 y/o que las células Th actúen como células efectoras directas a través de citotoxicidad mediada por perforina o a través de citocinas citotóxicas como TNF o linfotóxina. Independientemente de los mecanismos protectores, este modelo ofrece una excelente oportunidad para el estudio de la inducción de una respuesta protectora de células T generadas en el NALT y que actúa en a nivel del GALT, ya que es un modelo de inducción de células Th monoclonal.

## **2.2 INF- $\lambda$ como regulador de infección por Rotavirus**

La familia de citocinas IFN- $\lambda$  pertenece a los IFN de tipo III, que en humanos están conformados por IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 e IFN- $\lambda$ 3, también llamados IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente. Recientemente un cuarto tipo IFN- $\lambda$ 4 se ha descubierto, mientras que en ratones sólo se expresa IFN- $\lambda$ 2 e IFN- $\lambda$ 3 (Pott *et al.*, 2011). El receptor de superficie celular de IFN III es heterodimérico y está compuesto por dos cadenas, una cadena es IFNLR1, solo la familia de IFN- $\lambda$  contiene esta cadena, la segunda cadena es IL10R $\beta$ , esta cadena también se encuentra en receptores de citocinas relacionadas con IL-10. La unión a este receptor activa la vía de transducción de señales JAK-STAT que culmina en la activación de cientos de genes ISG, como se mencionó anteriormente (Hermant y Michiels 2014)

La especificidad de la respuesta de IFN- $\lambda$  esta determinada por la distribución de su receptor, el cual a comparación de IFN tipo I, está mucho más acotada. Los estudios sugieren que las células epiteliales, queratinocitos y células de melanoma son algunos de los principales productores de IFN III, de este modo IFN- $\lambda$  ofrece protección en zonas importantes de MALT como el pulmón, piel o tracto gastrointestinal. También se ha informado la expresión del receptor en células dendríticas convencionales (cDC), plasmocitoides (pDC) y eosinófilos intestinales (Yin *et al.*,2012)

En el intestino IFNLR1 se expresa preferentemente en IEC, estos producen la mayoría de IFN- $\lambda$  ante infección por rotavirus en el intestino delgado (Lee y Baldrige 2017). De esta manera, IFN- $\lambda$  se activa en respuesta a infecciones de la mucosa que amenazan su integridad. IFN- $\lambda$  actúa sobre los neutrófilos para modular las respuestas que dañan los tejidos, como la

liberación de especies reactivas de oxígeno (Broggi *et al.*,2020), reduce la migración de neutrófilos a tejidos inflamados y promueve la inmunidad adaptativa humoral al estimular las IEC e influye en la función de las CD para promover las células T de memoria (Ye *et al.*,2019), así IFN- $\lambda$  mantiene un estado antiinflamatorio que salvaguarda la función de la barrera epitelial intestinal. La respuesta compartimentalizada de IFN- $\lambda$ , se debe a que es expresado por las IEC de manera preferente ante infecciones virales *in vivo*, así como la expresión de su receptor (Bhushal *et al.*, 2017), IFN- $\lambda$  responde preferentemente ante virus que infectan las células epiteliales, mientras que IFN tipo I son fundamentales ante infecciones que eluden la capa epitelial y se propagan sistémicamente. Reportes demuestran la acción conjunta de IFN I e IFN III en el control de infección por rotavirus (Lin *et al.*,2016; Ingle *et al.*, 2018; Feng *et al.*, 2008), aunque IFN- $\lambda$  es más estudiado por su acción directa sobre las IEC, estudios recientes también destacan la importancia de las citocinas para frenar la inflamación de modelos intestinales (Rauch *et al* 2015; Broggi *et al.*, 2020)

### **2.3 Vacunación intranasal ante infección por Rotavirus**

Para varios de los patógenos la mucosa nasal es la primera barrera con la que tienen contacto y como se mencionó anteriormente, NALT representa un importante sitio de inducción, la administración de vacunas intranasales (i.n) ofrece protección en otras regiones de la mucosa (tracto respiratorio, gastrointestinal y genital) así como sistémica (Anggraeni *et al.*, 2022; Birkhoff *et al.*, 2009). Dentro de las ventajas que ofrece la vacunación intranasal se encuentran; su facilidad de autoadministración, así como fácil administración por personal menos capacitado (lo cual representa menor coste en vacunaciones masivas), no es invasiva, lo cual resulta ventajoso para ciertas poblaciones como niños, pacientes de edad avanzada y pacientes con VIH, se pueden utilizar formulaciones líquidas y de polvo seco, esta última opción representa beneficios claros en los problemas de transporte (conservación de la cadena de frío), lo cual prolonga su vida útil (Birkhoff *et al.*, 2009). La presencia de microvelocidades en el epitelio nasal aumenta la captación de antígeno, sin embargo, las barreras físicas como cilios, moco y el epitelio escamoso queratinizado, bloquean la entrada de sustancias extrañas, lo cual puede retrasar la absorción de la vacuna (Anggraeni *et al.*, 2022)

La vía intranasal ha resultado óptima para el diseño de vacunas contra rotavirus, en 1998, Choi y col. realizaron estudios con 2/6 VLP (del inglés, “virus like particles”), compuestos por las proteínas VP2 y VP6 de rotavirus, con enterotoxina lábil (LT) como adyuvante, fue administrado de manera intranasal a ratones e indujo protección mayor al 90 % ante infección con rotavirus. Mc Neal *et al.* 1999, realizó estudios utilizando partículas purificadas de rotavirus de doble o triple capa, con LT como adyuvante, fueron inoculados de manera i.n ratones BALB/c, observaron protección completa al administrar dos dosis de partículas de rotavirus de triple capa. Cabe mencionar que en ninguno de los estudios anteriores está claro el mecanismo de protección. Cubriendo este aspecto, en 2002 Mc Neal y col. investigaron los mecanismos de protección de una vacuna i.n, basada en la proteína VP6, administrada con LT como adyuvante, en el estudio se identificó a linfocitos T  $\alpha\beta$  CD4 como participantes indispensables en la protección contra rotavirus, se reportó protección independiente de células T CD8 y células B.

### 3. Justificación

Los antígenos peptídicos son de gran interés como posibles medios de estudio porque no requieren organismos vivos para la síntesis y se pueden adaptar a determinantes antigénicos específicos que median la protección contra enfermedades o infecciones.

Varios estudios reportan el uso de epítomos específicos de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, restringidos por el MHC, de proteínas como VP6 de RV, para analizar la distribución y cinética de la respuesta de células T después de la infección por rotavirus. Dado que en humanos es difícil estudiar células T específicas de antígeno intestinal *in situ*, los estudios dirigidos a caracterizar estas células se han limitado principalmente a la identificación de células T circulantes que han sido inducidas después de la infección intestinal (Jaimes *et al.*,2002)

Usando el modelo de vacunación i.n. con el péptido de VP6<sub>289-302</sub>, en este trabajo se propone estudiar como células Th epítomo específicas inducidas en la mucosa nasal (NALT), ejercen su función protectora contra la infección por rotavirus en la mucosa intestinal. Los resultados de este trabajo aportarán conocimiento sobre la respuesta inmune de mucosas, en la posible implementación de vacunas de nueva generación contra rotavirus y en el diseño de vacunas e inmunoterapias para patologías intestinales, como cáncer y procesos inflamatorios.

#### **4. Hipótesis**

H1: La vacunación intranasal con el péptido sintético de VP6<sub>289-302</sub>, provocará la inducción de un perfil de citocinas pro-inflamatorias y un aumento en la expresión de INF- $\lambda$  por parte de células epiteliales intestinales.

H2: La producción de estas citocinas correlacionará con el nivel de protección contra la infección por rotavirus.

#### **5. Objetivos**

##### **- Objetivo general**

Evaluar la respuesta contra la infección por rotavirus de las células epiteliales y Th intraepiteliales intestinales en ratones vacunados i.n con el péptido sintético 289-302 de VP6.

##### **- Objetivos particulares**

- 1.- Determinar los niveles de mensaje para INF- $\lambda$  en células epiteliales intestinales dentro de una cinética de infección por RV en un modelo de vacunación intranasal.
- 2.- Determinar el perfil de citocinas pro y antiinflamatorias producidas por las células Th intraepiteliales, dentro de una cinética de infección por rotavirus en un modelo de vacunación i.n.

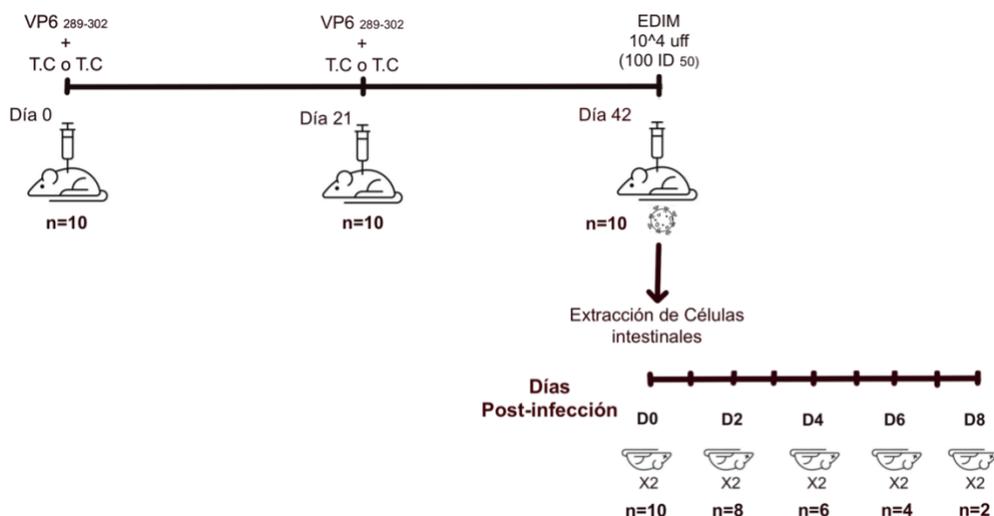
## 6. Metodología

**Animales.** - Se emplearon ratones hembra BALB/c (H-2<sup>d</sup>) de 5 a 6 semanas de nacidos libres de patógenos del Instituto de Biotecnología, UNAM, los cuales se alojaron en el biotero de la Facultad de Medicina, UAEM en contenedores de policarbonato (5 por caja) con un lecho de aserrín estéril, a temperatura ambiente (20-27 °C), bajo condiciones estándar de luz (12 h luz-oscuridad) con agua y alimento *ad libitum*.

**Péptido sintético.** - La secuencia del péptido sintético utilizado corresponde a NH<sub>2</sub>-RLSFQLVRPPNMTP-COOH, de la región 289-302 de la proteína estructural VP6 del rotavirus murino EDIM. Este fue sintetizado por EZBiollab, (Carmel, IN, EUA).

**Diseño experimental.** - Grupos de 8 a 12 ratones fueron inoculados i.n. con 50 µg del péptido sintético VP6<sub>289-302</sub> en presencia de 2.5µg de toxina de cólera (TC) (Sigma) como adyuvante. Después de 21 días, los ratones se re-inocularon de la misma manera y 21 días después de la segunda inoculación se retaron oralmente con el rotavirus murino EDIM. Como controles, se incluyeron grupos de ratones inoculados con PBS+ TC sola. De esta manera, cada experimento incluirá 2 grupos diferentes. A los días 0, 2, 4, 6 y 8 post-infección se sacrificaron 2 ratones por grupo y se obtuvieron las IEC así como los IEL (Figura 10). Asimismo, se evaluó la carga viral en las heces para determinar el nivel de protección contra la infección, la cual se calculó al comparar la media del antígeno viral por día de ambos grupos (inmunizado y control)

**Infección de ratones.** - Los ratones fueron inoculados oralmente con 100 µl de bicarbonato de sodio al 1.33 % para neutralizar los ácidos estomacales, que en ratones adultos pueden reducir la infección por rotavirus. Enseguida se administraron 100 µl de DMEM sin suero con 1x10<sup>4</sup> uff del rotavirus murino silvestre EDIM (100DI-50). Estudios previos hechos por Ward, McNeal y Sheridan (1992) han encontrado en este modelo de infección de ratón adulto que los virus murinos se excretan en las heces desde el día 2 y hasta los días 5-6, para después a los días 7 y 8 desaparecer por completo de las heces. De esta manera, se colectaron las heces, 8 días consecutivos post-infección, para determinar los niveles de virus excretados, como parámetro de replicación viral. La protección se midió como carga viral en heces de ratones inmunizados/carga viral en heces de ratón inoculado con PBS.



**Figura 10. Esquema de inoculación intranasal, reto con rotavirus y obtención de células intestinales.**

**Ensayo de ELISA para detección de Rotavirus.** – Se colectaron las heces de ambos grupos de ratones (Inmunizado péptido y control), durante 8 días a partir del reto con EDIM y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las heces se disgregaron en solución diluyente (TNC, 5% FBS, 0.05% Tween-20, 10mM  $\text{NaN}_3$ ) a una concentración de 5 (w/v), posteriormente se dejó reposar toda la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Se sensibilizó la placa con CABRAX 1:5000 con PBS con  $50\text{ }\mu\text{l}$  por pozo. Se selló la placa con plástico wrap, se incubó toda la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  o 2 hrs a T.A. Posteriormente, se lavó la placa con TNC+ 0.05% Tween ( $150\text{ }\mu\text{l}$  por pozo). Se bloqueó la placa con TNC + 0.05% Tween + 5% de leche descremada ( $150\text{ }\mu\text{l}$  por pozo) y se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por una hora. Se lavó 2 veces con TNC+ 0.05% Tween ( $150\text{ }\mu\text{l}$  por pozo). Se cargó la muestra por duplicado ( $150\text{ }\mu\text{l}$  por pozo) y se incubó por una hora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por una hora. Se lavó 4 veces con TNC ( $150\text{ }\mu\text{l}$  por pozo). Se colocó anticuerpo de captura (conejo anti-rotavirus) 1:2000 en TNC+ Tween ( $150\text{ }\mu\text{l}$  por pozo) y se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por una hora. Se lavó 4 veces con TNC ( $150\text{ }\mu\text{l}$  por pozo). Se colocó anticuerpo anti-conejo 1:2000 con TNC ( $150\text{ }\mu\text{l}$  por pozo) y se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por una hora. Se lavó 4 veces con TNC ( $150\text{ }\mu\text{l}$  por pozo). Se colocó el substrato PNPP  $1\text{ }\mu\text{l}$  en 1000 de dietanolamina al 0.1%, ( $150\text{ }\mu\text{l}$  por pozo) se cubrió de la Luz y fue incubada a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se leyó la placa a 405 nm a los 30, 45 y 60 minutos.

**Obtención de células epiteliales intestinales.** – Los linfocitos intraepiteliales intestinales (IEL) y células epiteliales intestinales (IEC) fueron extraídos de acuerdo con el protocolo previamente descrito en nuestro laboratorio. Se retiró el intestino delgado, se mantuvo a 4 °C en PBS para remover la grasa, tejido conectivo, heces y PP. Posteriormente, se cortó longitudinalmente y después transversalmente en piezas de 5 a 10 mm de largo y se lavaron de 3 a 4 veces con PBS para remover las heces restantes. Los IEL y las IEC se disociaron del tejido intestinal mediante agitación constante 100 r.p.m./40 min/37 °C en 30 ml de medio RPMI 1640 con 2 mM DTT y 5 mM EDTA. El sobrenadante se filtró a través de un colador celular de 70 µm y el botón celular se re-suspendió en percoll (Pharmacia) isotónico al 36% (100% percoll= 4 partes [4 ml] + 6 partes PBS 10X). El gradiente de percoll se montó; 36% sobre percoll al 67%, posteriormente se centrifugó a 500xg durante 30 min a T.A. Las IEC se recuperaron del sobrenadante de la fase 36, mientras que los IEL se recuperaron de la interfase 36/67. Posteriormente, se resuspendieron en PBS y se centrifugaron 10 min a 2000 g/4 °C. El botón celular ( $5 \times 10^6$  de células) se re-suspendió completamente en 500 µl de TRizol® (Invitrogen) y las células se lisaron por 5 min a temperatura ambiente. Se almacenaron las muestras a -80 °C hasta su uso.

**Extracción de RNA.** - Las células conservadas en Trizol, fueron descongeladas a T.A, enseguida, se añadió 200 µl de cloroformo, se agitó por inmersión, seguido de 10 min en hielo, posteriormente se centrifugó por 15 min a 15,000 rpm a 4 °C. Se extrajo la fase superior (que contiene el RNA) y se transfirió a tubos nuevos libres de RNAsas. Al extracto se añadió 500 µl de Isopropanol (para precipitar el RNA), se mezcló por inmersión y se centrifugó durante 10 min a 15,000 rpm; 4 °C. La fase acuosa fue decantada y a la pastilla obtenida se colocó 1 ml de etanol 75% y se centrifugó durante 5 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla obtenida se secó a T.A por 15 min y, finalmente, se disolvió en 20 µl de agua DEPC. Para solubilizar completamente el RNA se calentaron los tubos en baño maria a 65 °C durante 5 min. Para cuantificar y determinar la pureza del RNA se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 260 nm.

**Transcripción Reversa (RT).** - Se realizaron reacciones de 12  $\mu$ l, las cuales contenían; 1  $\mu$ l de oligo DT, 1  $\mu$ l de agua DEPC y el equivalente a 2000 ng de muestra de RNA; desnaturalizado 5 min 65 °C, posteriormente se añadió 2.4  $\mu$ l de Buffer de reacción, 1  $\mu$ l de dNTP's, 0.125  $\mu$ l de RT (Thermo Scientific) incubando 60 minutos a 42 °C. Al término de la incubación las muestras de cDNA fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

**Primers para citocinas.** - Las secuencias de primers (forward y revers) para cada una de las citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-22 (proinflamatorias), IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  (antiinflamatorias), han sido reportadas (Autenrieth *et.al* 1997; Schnepf *et.al* 2021). La síntesis de los primers se realizó en la Unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, la secuencia de los primers y tamaño esperado del amplicon se describen en la siguiente tabla.

Citocina	Primer forward	Primer reverse	Amplifica
<b><math>\beta</math>- actina</b>	ATG GAT GAC GAT ATC GCT	ATG AGG TAG TCT GTC AGG T	569 pb
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	TGA ACG CTA CAC ACT GCA TCT TGG	CGA CTC CTT TTC CGC TCC CTG AG	250pb
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C	ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G	300 pb
<b>IL-17</b>	GCT CCA GAA GGC CCT CAG A	CTT TCC CTC CGC ATT GAC A	140 pb
<b>IL-22</b>	CAT GCA GGA GGT GGT ACC TT	CAG ACG CAA GCA TTT CTC AG	198 pb
<b>IL-4</b>	TAG TTG TCA TCC TGC TCT T	CTA CGA GTA ATC CAT TTG C	404 pb
<b>IL-10</b>	AAC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA	CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A	237 pb
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	CCT CCC CCA TGC CGC CCT CG	CCA GGA ATT GTT GCT ATA TTT CTG	545 pb

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** - Para cada uno de los cDNA obtenidos en la reacción de RT se tomó 1  $\mu$ l, para mezclar con 0.5  $\mu$ l de enzima Taq DNA polimerasa, 2  $\mu$ l de Buffer de reacción de PCR, 2  $\mu$ l dNTP's (2 mM), 2  $\mu$ l de MgCl<sup>2</sup> y 11  $\mu$ l de agua DEPC (volumen total por reacción de 20  $\mu$ l). Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

<b>Condiciones de PCR</b>				
	<b>30 ciclos</b>			
<b>Desnaturalización inicial</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Alineamiento</b>	<b>Extención</b>	<b>Exención final</b>
94°C -1 min	92°C-45 seg	65°C-1 min	62°C- 1 min	72°C- 10 min

Los productos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, en Buffer TAE (Tris base, ácido acético, EDTA 0.5 M; pH 8) y teñidos con 10 µl de Bromuro de Etidio, las bandas obtenidas fueron visualizadas y fotografiadas mediante la exposición a través de luz UV.

**Evaluación de los niveles de RNAm para IFN-λ en células epiteliales.** - Ratones dos veces inoculados con el péptido se retaron con el rotavirus murino EDIM y se obtuvieron las células epiteliales intestinales a los 0, 2, 4, 6 y 8 días post-infección. Se obtuvo el RNA total por el método de Trizol y el RNAm específico para IFN-λ se convertirá a cDNA por medio de RT. La cantidad relativa del mensaje para IFN-λ, se evaluó por medio de PCR punto final, la secuencia de los oligos utilizados, así como el tamaño del amplión se muestran en la siguiente tabla. La expresión del RNAm se normalizó con respecto a la expresión del RNAm para β-actina.

<b>IFN</b>	<b>Primer forward</b>	<b>Primer reverse</b>	<b>Amplifica</b>
IFN-λ	AGCTGCAGGTCCAAGAGCCCC	GGTGGTCAGGGCTGAGTCATT	96 pb

**Cuantificación de las bandas obtenidas en el ensayo de PCR.** - Las fotografías de los geles obtenidas en el PCR, fueron analizadas en el programa Image J, donde se obtuvieron las densidades (píxel/cm<sup>2</sup>) de la amplificación de los mensajeros de cada una de las citocinas, fueron normalizadas y graficadas en relación con el gen constitutivo β-actina.

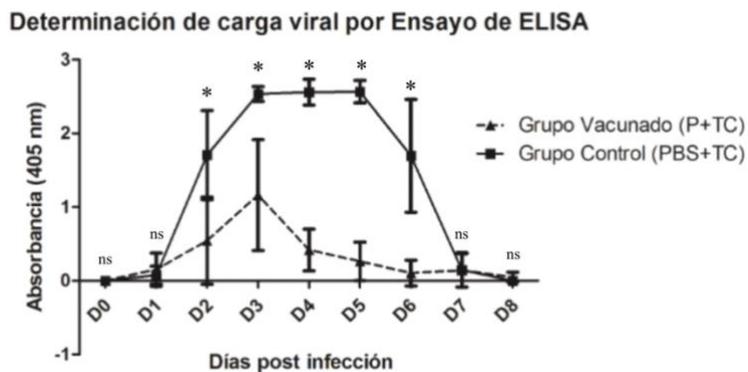
**Análisis estadístico.** - Los experimentos serán realizados al menos en 3 ocasiones de manera independiente. Los datos que se obtengan se procesarán en el programa Excel y se expresarán

como la media +/- desviación estándar. La significancia de la diferencia entre los grupos experimentales se determinará a través de la prueba t-student para datos pareados con ayuda del software Prism 5.0 (GraphPad Software Inc). A los resultados se les aplicará la prueba de Tukey como prueba post-Hoc, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$

## 7. Resultados

### 7.1. Montaje del modelo de vacunación i.n. con el péptido de VP6<sub>289-302</sub>

Grupos de 4 ratones BALB/c fueron inoculados i.n. dos veces con 50 µg del péptido sintético de VP6<sub>289-302</sub> en presencia de 2.5 µg de TC como adyuvante, o TC sola como control, con una separación de 21 días. Veintiún días después, los ratones fueron retados oralmente con  $1 \times 10^4$  uff del rotavirus murino silvestre EDIM (100\_DI<sub>50</sub>) y las heces fueron colectadas diariamente por 8 días. La carga viral en las heces se determinó por un ensayo de ELISA tipo sándwich como se describe en Materiales y Métodos. Como se esperaba, el grupo control mostró una curva de replicación clásica, que inicia el día 2 y termina los días 7/8 post-infección (Figura 1). Por el contrario, el grupo de ratones vacunados con el péptido tuvo un ligero aumento de la replicación viral a los días 2, 3 y 4 para posteriormente bajar a niveles de fondo. Comparando el área bajo la curva de la replicación viral de los dos tratamientos, se encontró que los ratones vacunados con el péptido más toxina de cólera tuvieron una reducción del 75% (protección) con respecto a los ratones inoculados solamente con la toxina de cólera.



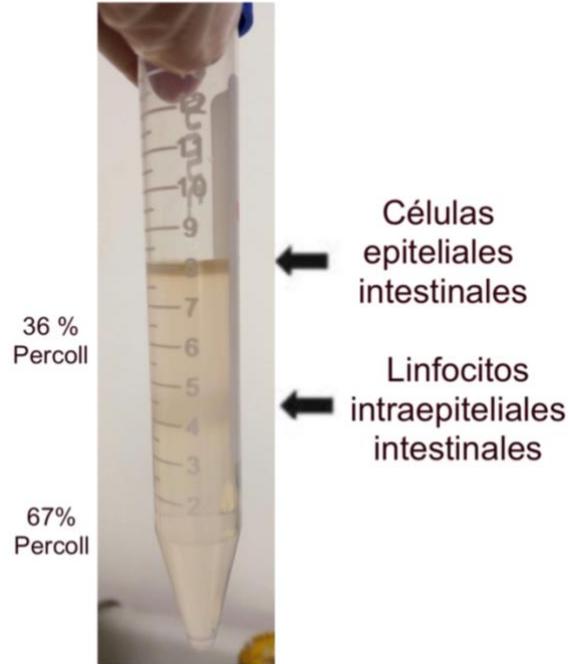
**Figura 1. El péptido de VP6<sub>289-302</sub> inoculado i.n. induce protección contra la infección por rotavirus.** Ratones BALB/c fueron inoculados i.n. con el péptido de VP6<sub>289-302</sub> (P) más TC, o con TC sola, dos veces y retados con el rotavirus murino EDIM. Las barras representan la DS de la absorbancia promedio dentro del grupo. Análisis estadístico, prueba t de student datos no pareados; \*  $p < 0.05$ , ns; no significativo.

La cinética de replicación viral en los ratones BALB/c vacunados con el péptido sintético e infectados con EDIM en este estudio y el nivel de protección, coinciden con estudios reportados anteriormente en este laboratorio (Álvarez, 2018) y con modelos murinos de infección con rotavirus reportados (Du *et al.* 2017; McNeal y Sheridan, 1900)

## **7.2 Efecto de la vacunación sobre la producción de citocinas por las células epiteliales intestinales y linfocitos intraepiteliales en respuesta a la infección por rotavirus**

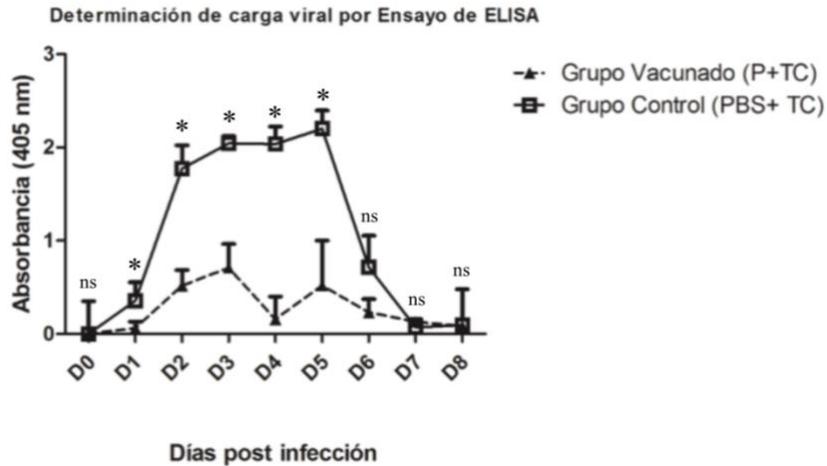
El objetivo original del proyecto fue analizar el nivel de mensajero para IFN- $\lambda$  en las IEC por RT-PCR y la expresión de citocinas intracelulares pro y antiinflamatorias en los EIL por citometría de flujo. Sin embargo, se decidió que, en vez de analizar las citocinas intracelulares por citometría de flujo en los IEL, también se evaluarán los niveles RNAm por RT-PCR, dada la poca disponibilidad de citómetro de flujo durante la pandemia.

De esta manera, una vez montado el modelo de vacunación, se procedió a realizar un primer experimento en el cual se inmunizaron 12 ratones i.n con el péptido sintético VP<sub>6</sub><sub>289-302</sub> más TC y 12 ratones con T.C solamente, como controles. Veintiún días después, se reinmunizaron ambos grupos. Veintiún días después de la segunda inoculación, los ratones fueron retados con el virus EDIM y a los días 0, 2, 4, 6 y 8 post-infección se obtuvieron las IEC y los IEL intestinales de dos ratones, se purificaron mediante un gradiente de percoll (Figura 2) y se almacenaron a -80 °C en Trizol, para el posterior análisis del RNAm de IFN- $\lambda$  en las IEC y los IEL.



**Figura 2. Separación de células por gradiente de Percoll**

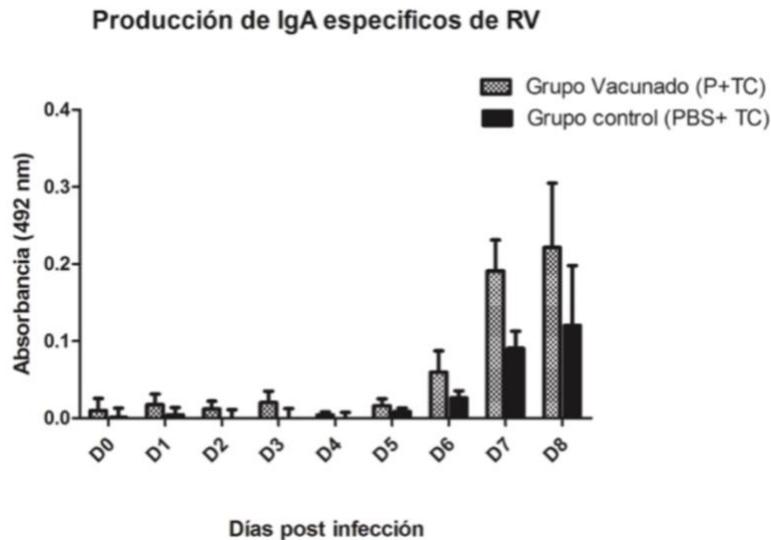
Para validar el experimento, se determinaron la carga viral y los niveles de los anticuerpos IgA anti-rotavirus en las heces de los ratones vacunados. Se encontró, como se esperaba, que la vacunación con el péptido sintético más TC indujera una reducción de los niveles de virus excretados del 73% con respecto a los ratones inoculados solamente con la TC (Figura 3)



**Figura 3. El péptido VP6<sub>289-302</sub> inoculado i.n. induce protección contra la infección por rotavirus.** Ratones BALB/c fueron inoculados i.n. con el péptido de VP6<sub>289-302</sub> (P) más TC. o con TC sola. dos veces y retados con el rotavirus murino EDIM. La carga viral en las heces fue determinada por un ensayo de ELISA tipo sandwich. Las barras representan la DS de la absorbancia promedio dentro del grupo. Análisis estadístico, prueba t de student datos no pareados; \*  $p < 0.05$ , ns; no significativo.

Se detectó la presencia de IgA anti-rotavirus en heces de los ratones inmunizados mediante un ensayo de ELISA de captura. En este modelo, la secreción de IgA anti-rotavirus en los ratones inicia entre los días 4-6 post-infección (Du *et al.*, 2017) (Figura 4). Se encontró que en ambos grupos, las IgAs anti-rotavirus se incrementaron claramente desde el día 6 y hasta el día 8 post-infección (Figura 4).

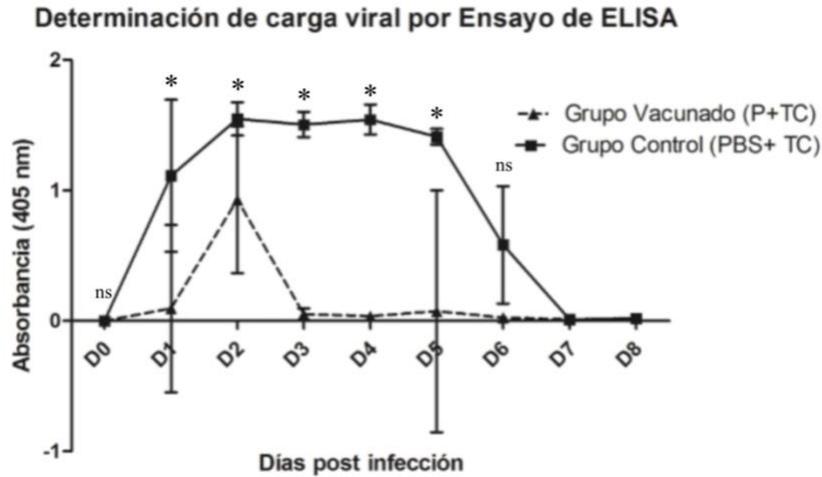
Estos resultados indican que los ratones vacunados con el péptido VP6<sub>289-302</sub> se protegían contra la infección y secretaban niveles de IgA anti-rotavirus similares al control, por lo cual resultaba pertinente la evaluación de los niveles del mensaje de IFN- $\lambda$ . Sin embargo, en este primer experimento no fue posible amplificar el mensaje para el gen constitutivo de  $\beta$ -actina a partir de cDNA en ninguna de las muestras obtenidas. Esto se debió al bajo número de células que se obtuvieron y, muy probablemente, a la degradación del RNA (resultados no mostrados).



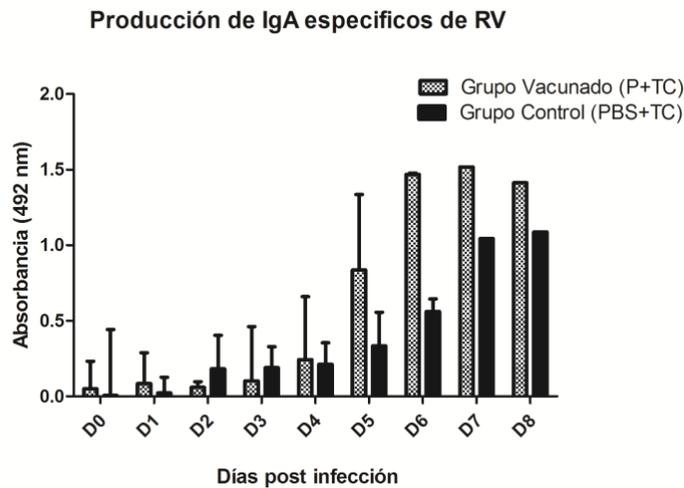
**Figura 4. Presencia de IgA intestinal anti-rotavirus en heces de ratones inmunizados e infectados con el virus EDIM.** La producción de IgA fue determinada mediante un ensayo de ELISA de captura. La cuantificación se realizó durante los 8 días posteriores a la infección con EDIM. Como primer anticuerpo se utilizó un anticuerpo policlonal hiper-inmune de cabra contra rotavirus y como anticuerpo de detección se empleó un anticuerpo policlonal contra rotavirus producido en conejo. El ensayo se reveló con un anticuerpo policlonal contra IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina y se leyó en un lector de placas de ELISA a 492nm.

Se realizó un segundo experimento en el cual se inmunizaron 8 ratones i.n con el péptido sintético VP<sub>6</sub><sub>289-302</sub> más TC y 8 ratones con TC como control. Se realizó el protocolo de extracción de células de acuerdo con lo descrito en la metodología, aislándose las IEC y los IEL para almacenarse a -80 °C en TRizol, para su posterior análisis.

Al igual que el primer experimento, se determinó la carga viral, así como la producción de anticuerpos IgA específicos contra rotavirus. Se obtuvo un resultado similar observando una reducción de carga viral del 80% comparando el grupo vacunado contra el grupo control (Figura 5). Así también se observó la inducción de IgA anti-rotavirus en heces a partir del día 4 y hasta el día 8 (Figura 6). Lo cual validaba el experimento.



**Figura 5. ELISA carga viral para la segunda repetición del modelo de vacunación.** Ratones BALB/c fueron inoculados i.n. con el péptido VP<sub>6289-302</sub> (P) más TC, o con TC sola dos veces, y retados con el rotavirus murino EDIM. La carga viral en las heces fue determinada por un ensayo de ELISA tipo sandwich. Las barras representan la DS de la absorbancia promedio dentro del grupo. Análisis estadístico, prueba t de student datos no pareados; \*  $p < 0.05$ , ns; no significativo.



**Figura 6. Presencia de IgA intestinal anti-rotavirus en heces de ratones inmunizados e infectados con el virus EDIM.** La producción de IgA fue determinada mediante un ensayo de ELISA de captura. La cuantificación se realizó durante los 8 días posteriores a la infección con EDIM. Como primer anticuerpo se utilizó un anticuerpo policlonal hiper-inmune de cabra contra rotavirus y como anticuerpo de detección se empleó un anticuerpo policlonal contra rotavirus producido en conejo. El ensayo se reveló con un anticuerpo policlonal contra IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina y se leyó en un lector de placas de ELISA a 492nm.

Partiendo de las IEC y IEL aislados del grupo control y vacunado, se realizó la extracción de RNA, sin embargo, durante el procedimiento se presentó degradación de muestras tanto en IEC como en IEL en ambos grupos (control y vacunado). Esto se concluyó después de revisar las lecturas de concentración de RNA  $\leq 1$  ng/  $\mu$ g y la ausencia de amplicon para el gen constitutivo de  $\beta$ -actina (Para las muestras indicadas en rojo en las Tablas 3 y 4 no se tienen los análisis posteriores).

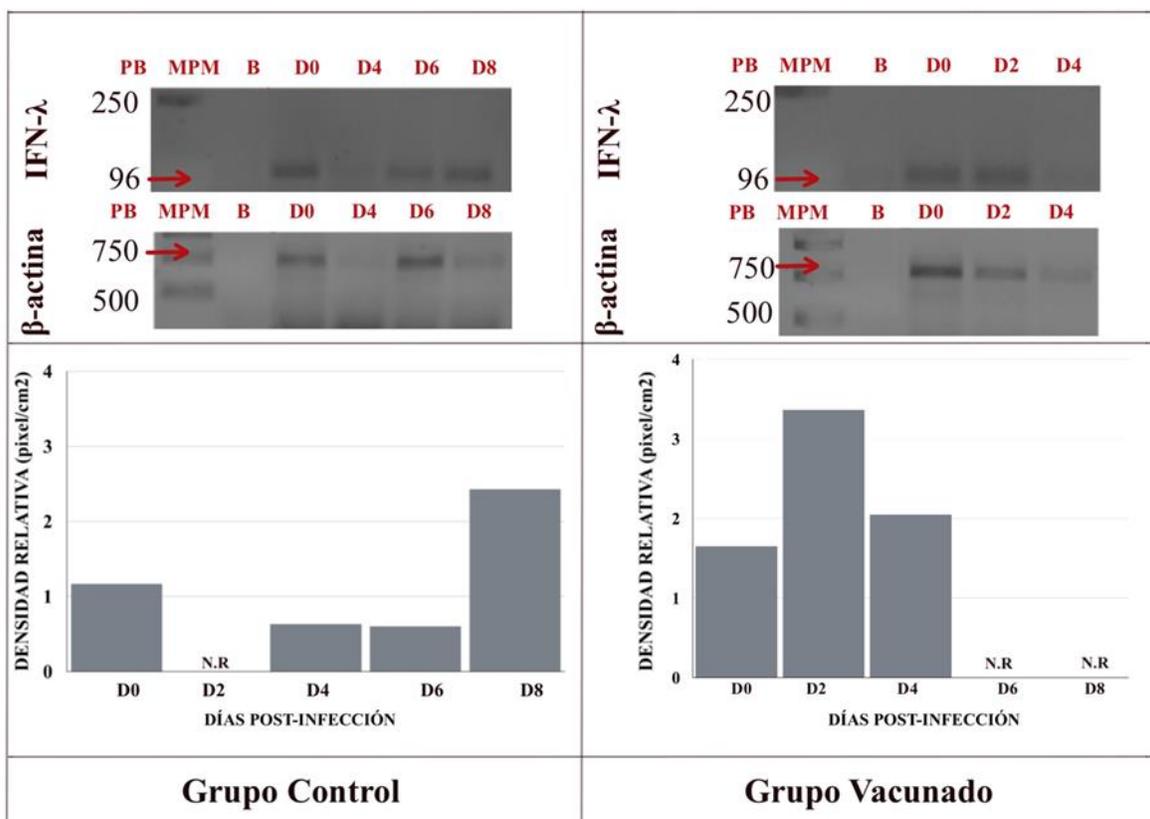
Tabla 3. Datos de extracción RNA de células epiteliales intestinales								
Día	Grupo Control (PBS+TC)				Grupo Vacunado (P+TC)			
	# Células	Concentración RNA (ng/ $\mu$ g)	A260/A230	A260/A280	# Células	Concentración RNA (ng/ $\mu$ g)	A260/A230	A260/A280
D0	2.9x10 <sup>6</sup>	7.285	0.646	1.491	1.3x10 <sup>6</sup>	9.22	1.622	1.5
D2	<b>1x10<sup>6</sup></b>	<b>1.400</b>	<b>0.131</b>	<b>2.224</b>	3.8x10 <sup>6</sup>	12.3	<b>2.07</b>	1.77
D4	2.7x10 <sup>6</sup>	18	1	1.8	4.1x10 <sup>6</sup>	10.12	<b>2.08</b>	1.6
D6	1.6x10 <sup>6</sup>	10.98	1.15	1.59	<b>0.6x10<sup>6</sup></b>	<b>1.612</b>	<b>0.328</b>	<b>1.2</b>
D8	4.1x10 <sup>6</sup>	19.77	1.928	1.79	<b>0.4x10<sup>6</sup></b>	<b>1.981</b>	<b>2.029</b>	<b>1.71</b>

Tabla 4. Datos de extracción de RNA de linfocitos intraepiteliales								
Día	Grupo Control (PBS+TC)				Grupo Vacunado (P+TC)			
	# Células	Concentración RNA (ng/ $\mu$ g)	A260/A230	A260/A280	# Células	Concentración RNA (ng/ $\mu$ g)	A260/A230	A260/A280
D0	2.0x10 <sup>6</sup>	4.073	<b>2.0</b>	1.744	2.0x10 <sup>6</sup>	4.207	1.467	<b>2.38</b>
D2	<b>0.5x10<sup>6</sup></b>	<b>0.425</b>	<b>0.238</b>	<b>2.70</b>	2.0x10 <sup>6</sup>	5.3	<b>2.07</b>	1.77
D4	1.1x10 <sup>6</sup>	2.051	1.127	4.19	<b>1x10<sup>6</sup></b>	<b>1.239</b>	<b>0.137</b>	<b>2.8</b>
D6	2.5x10 <sup>6</sup>	2.262	1.035	1.48	<b>0.3x10<sup>6</sup></b>	<b>0.977</b>	<b>0.265</b>	<b>1.87</b>
D8	3.5x10 <sup>6</sup>	3.12	1.08	<b>2.34</b>	1.5x10 <sup>6</sup>	5.527	1.53	1.76

Las densidades ópticas (O.D) a 260/230 y 260/280 nm son utilizadas para medir la concentración de ARN o ADN usando la ley de Beer-Lambert, la cual predice una correlación lineal entre absorbancia y concentración. Así, se establece que el ARN puro tendrá un valor A<sub>260/230</sub> de 2.1 (valores menores a este pueden indicar contaminación de la muestra por isopropanol o etanol) y un valor A<sub>260/280</sub> ente 1.8-2.1 (valores fuera de este rango indican contaminación por proteínas)

Como se muestra en las Tablas 3 y 4 los valores de  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$  obtenidos en este ensayo no se cumplen en su mayoría. Sin embargo, se realizó el paso a cDNA como se describe en la metodología de cada una de las muestras y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

El cDNA obtenido de las células epiteliales intestinales fue amplificado en reacciones de PCR punto final para determinar los niveles de mensaje para  $\beta$ -actina e IFN- $\lambda$  a lo largo de la infección con rotavirus EDIM.

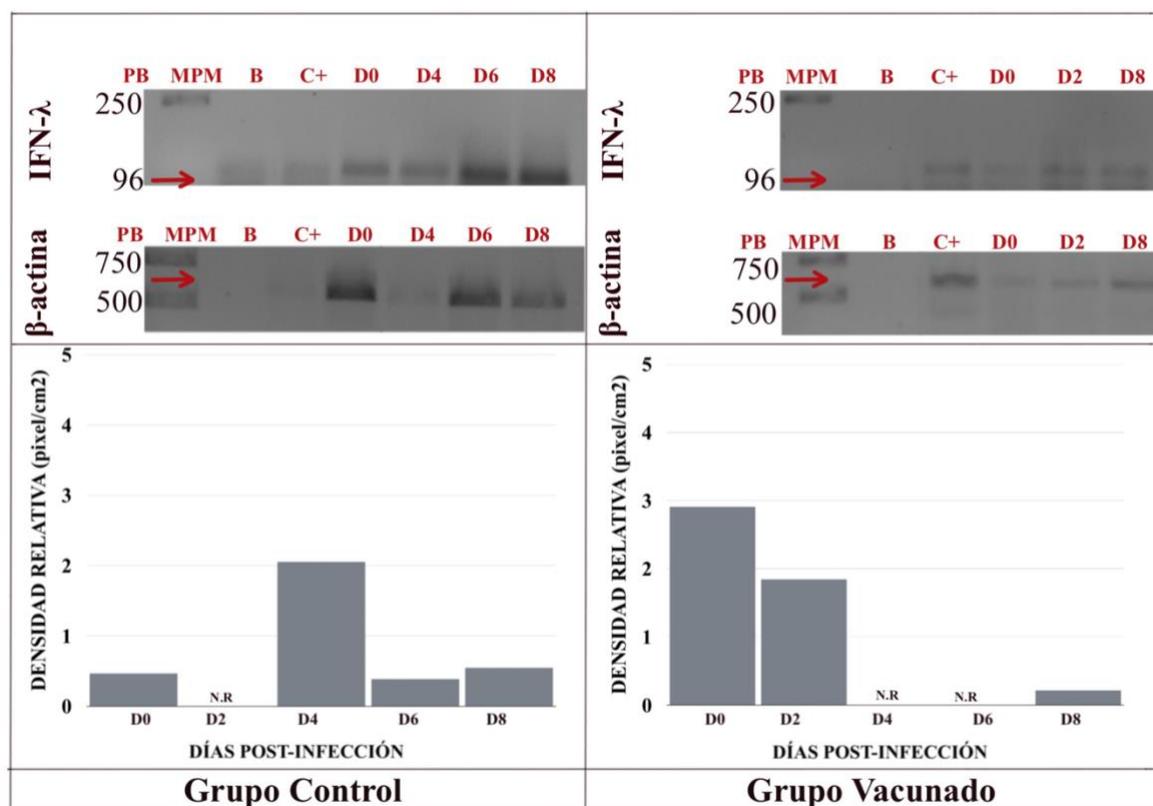


**Figura 6. Nivel de mensaje de IFN- $\lambda$  en IEC de ratones infectados con el virus EDIM.** Las densidades de banda para IFN- $\lambda$  fueron comparadas y graficadas con respecto a las bandas obtenidas de la amplificación de  $\beta$ -actina. (N. R; No realizado), (C+; Células dendríticas + LPS. utilizadas como controles positivos)

El tamaño esperado del amplicón para IFN- $\lambda$  es de 96 pb y de la  $\beta$ -actina de 750 pb, lo cual concuerda con los resultados obtenidos.

En relación a los niveles relativos del ARNm para IFN- $\lambda$ , en el grupo control (PBS+T.C) se observó aumento solamente al día 8 post-infección. Para el grupo vacunado, se observó un aumento del día 0 al día 2, disminuyendo a niveles casi basales para el día 4.

El procedimiento anterior también se realizó con el cDNA de los linfocitos intraepiteliales intestinales (IEL) (Figura 7). Dada la poca muestra obtenida, se decidió solamente evaluar el RNAm de IFN- $\lambda$  y no incluir el de las citocinas. En el grupo control se observó un aumento de los niveles relativos de ARNm para IFN- $\lambda$  del día 0 al día 4, posteriormente, disminuyeron los niveles de mRNA para el día 6 y teniendo un aumento de nuevo para el día 8. En cuanto al grupo vacunado, se observó que solamente al día 2 hay un ligero aumento con respecto al día 0 se tienen niveles de mensaje para IFN- $\lambda$  bastante altos. En comparación con los ratones



**Figura 7. Nivel de mensaje de IFN- $\lambda$  en IEL de ratones infectados con el virus EDIM.** Las densidades de banda para IFN- $\lambda$  fueron comparadas y graficadas con respecto a las bandas obtenidas de la amplificación de  $\beta$ -actina. (N.R= No realizado),(C+; Células dendríticas + LPS.utilizadas como controles positivos)

control hay un aumento aproximadamente 6 veces. Al día 2 se ve una disminución de aproximadamente 30% del mensaje, llegando a niveles basales al día 8.

## 8.- Discusión

El modelo de infección y vacunación utilizado en el laboratorio se replicó de acuerdo con lo establecido en la literatura (Burns *et al.*, 1995; Du *et al.*, 2017). Como se mencionó anteriormente, posterior a la infección con rotavirus diariamente se colectaron las heces de ambos grupos control y vacunado para determinar la carga viral. La excreción viral refleja la capacidad del huésped para erradicar el virus mediante la administración del tratamiento, los resultados obtenidos, muestran efectividad del modelo de vacunación. En el montaje del modelo de vacunación, para el grupo vacunado se observa aumento de la carga viral desde el día 2 hasta decaer en el día 7, resultados similares se han observado anteriormente en trabajos realizados en este laboratorio, administrando el péptido VP6<sub>287-304</sub> (Álvarez., 2018). En este primer experimento se obtuvo 75% de protección en el grupo vacunado con el péptido sintético de VP6<sub>289-302</sub> más T.C.

Una vez replicado el modelo de vacunación, en el primer experimento realizado, también se realizó un ELISA para evaluar la producción de IgA específicas para rotavirus. En ratones, los niveles de IgA específica de rotavirus intestinal o sérica y el nivel de protección están correlacionados (Desselberger y Huppertz., 2011; Blutt y Conner, 2013). Estudios previos han demostrado que la carencia de células B en ratones, resulta en deficiencia de la eliminación viral (Blutt *et al.*, 2012). En ratones BALB/c, la producción natural de IgA anti-rotavirus, se da en los días 6-7 (Du *et al.*, 2017), lo cual concuerda con nuestro modelo, tanto en el grupo control como en el vacunado, además de no observar diferencia significativa en la producción de IgA entre grupos, esto valida los estudios que han observado protección independiente de IgA tras la inmunización con la proteína VP6 quimérica (Mc. Neal *et al.*, 2006) de la cual deriva el péptido utilizado en este estudio. Sin embargo, para observar mejor la importancia de IgA específica contra RV, en los mecanismos de protección en este modelo de vacunación, sería necesario realizar estudios en ratones knockout a distintos niveles tanto de producción como de transporte de IgA.

La producción de IFN- $\lambda$  en IEC como respuesta ante infección por rotavirus está documentada en diversos estudios en modelos *in vivo* (Lee y Baldrige., 2017; Doldan *et al.*, 2022; Lin *et al.*, 2016; Hernández *et al.*, 2015; Pott *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2018; Álvarez,

2018), además se ha reportado su funcionamiento en conjunto con IL-22 e IFN-I (Hernández *et al.*, 2015; Ingle *et al.*, 2018). A pesar de que IFN-I e IFN- $\lambda$  cuentan con diferentes receptores, activan la misma vía de transducción de señal Jak-STAT, dada la semejanza de las vías se espera que INF- $\lambda$  influya tanto en la producción como en la respuesta de IFN- $\alpha/\beta$  y viceversa (Herman y Michiels., 2014). En estudios realizados en ratones knockout de IL-28R (receptor IFN- $\lambda$ R1) (Donnelly y Kotenko, 2010), se observó mayor susceptibilidad a la infección oral por RV que en ratones knockout de IFNAR (receptor de IFN-I), además se ha observado que la administración exógena de manera subcutánea de IFN- $\lambda$ 2 en ratones, mejoró el control de la infección por rotavirus, lo cual no se observó con la administración de IFN- $\alpha$  (Pott *et al.*, 2011). En este sentido, en un estudio previo realizado por Ding *et al.*, 2018, muestra resultados similares en células HT-29 humanas. En un estudio realizado por Lin *et al.*, 2016, se reporta una cepa de RV, EW-RV (cepa deriva de EDIM-RV), la cual es mayormente insensible a IFN- $\lambda$ . En este mismo estudio, se mostró que una cepa heteróloga de RV de simio, fue sensible tanto a IFN- $\alpha/\beta$  como a IFN- $\lambda$ , la razón de esta diferencia entre cepas aún no es clara.

La producción de mRNA de IFN- $\lambda$  en IEC e IEL de intestino, ante infección por RV tiene una tendencia a aumentar en el día 2 de la infección, esto se observó en el trabajo de Álvarez., 2018, realizado en este laboratorio. Cabe resaltar que anterior al trabajo de Álvarez, no se había reportado la producción de IFN- $\lambda$  por IEL ante infección por RV. Las IEC producen IFN tipo III ante infección viral (Hernandez *et al.*, 2015), los leucocitos generan IFN- $\lambda$  *in vitro*, mientras que los eosinófilos intestinales y pDC producen IFN- $\lambda$  *in vivo*, esto sugiere la posibilidad de contribuyentes adicionales para su inducción (Lee y Baldrige., 2017)

Como se ha mencionado, IFN- $\lambda$  es producido en respuesta a infección por virus entéricos, sin embargo, no se han reportado las vías de inducción para IFN- $\lambda$  en IEC/IEL ante infección por RV (Lee y Baldrige., 2017). Para la inducción de IFN tipo I durante infección por RV, se requieren RIG-I y MDA5, estos también inducen IFN III a través de la señalización de MAVS e IRF3/7 (Osterlund *et al.*, 2007). Se sabe que IRF1 tiene un rol en la inducción de IFN tipo III, siendo estimulado por MAVS asociado a peroxisomas, mientras que MAVS asociado a mitocondrias induce IFN tipo I, la reserva numerosa de peroxisomas en las IEC

podría explicar la inducción preferencial de IFN- $\lambda$  (Odendall *et al.*, 2014). Estudios realizados por Bender *et al.*, 2015 y Ding., 2018, indican que la activación de MAVS es independiente de su ubicación subcelular. Para este modelo de vacunación podría ser una posibilidad el estudio específico de esta ruta, dado que, RV también cuenta con una vía de inhibición de MAVS.

El péptido VP<sub>6287-304</sub> es específico de células Th, el objetivo de este trabajo fue aislar IEC e IEL y observar su perfil de citocinas, así como la correlación con la protección ofrecida ante infección por RV, sin embargo, no se logró aislar con éxito un número considerable de IEC/IEL para llevar a cabo el análisis. Está reportado que así como las células T convencionales, las IEL CD4<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> tienen características de células Th y las CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> muestran citotoxicidad en respuesta a patógenos de la mucosa, sin embargo, algunos IEL CD4<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> que expresan CD8 $\alpha\alpha$  muestran citotoxicidad con expresión de granzimas, esto nos muestra que las funciones de los IEL aún no se comprenden completamente. Adicionalmente se considera como un grupo de células con gran plasticidad, las variaciones en el ambiente intestinal como los microorganismos, influyen en sus características inmunitarias (Ma *et al.*,2020)

A pesar de que los resultados de este estudio no respaldan la hipótesis, el entendimiento de los mecanismos moleculares de protección mediante el análisis del perfil de citocinas es un punto clave en la comprensión de la regulación de la inmunidad innata, para futuros estudios se deben tener en cuenta varios aspectos, se debe considerar que durante la infección otras células como macrófagos o células dendríticas pueden producir citocinas, también tomar en cuenta otras citocinas y sus controles, otro punto a considerar es la edad de los ratones, en función de la vida media de las citocinas. Adicionalmente, los estudios de direccionamiento de células Th de NALT a MALT dado por la expresión de  $\alpha 4\beta 7$ /CCR9, son ejemplos de futuros estudios que se podrían realizar, así como la caracterización de iIEL y linfocitos intraepiteliales nasales (nIEL), también con modelos knockout de los receptores de las integrinas, para un mejor entendimiento sobre la migración de células para poder ejercer acción protectora en el intestino.

## CONCLUSIÓN

La vacunación i.n. con el péptido 289-302 de VP6 induce un estado antiviral temprano tanto en los linfocitos intraepiteliales como en las células epiteliales, que podría estar correlacionado con la protección inducida contra la infección intestinal por rotavirus.

## 9. Bibliografía

Suzuki H. Rotavirus replication: Gaps of knowledge on virus entry and morphogenesis. *Tohoku J Exp Med* 2019;248: 285– 96.

Arias C.F, Daniela Silva-Ayala, Susana López *Journal of Virology* Jan 2015, 89 (2) 890-893; DOI: 10.1128/JVI.01787-14

Díaz-Salinas MA, Silva-Ayala D , López S , Arias CF. 2014 . Los rotavirus alcanzan los endosomas tardíos y requieren el receptor de manosa-6-fosfato dependiente de cationes y la actividad de las proteasas de catépsina para ingresar a la célula . *J Virol* 88:389 - 4402 . doi: 10.1128 / JVI.03457-13.

Conner, ME y RF Ramig. 1997. Enfermedades entéricas virales, pág. 713-743. *En* N. Nathanson (ed.), *Patogénesis viral*. Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, Pensilvania.

Raming Robert F. *Journal of Virology*, septiembre de 2004, 78 (19) 10213-10220; DOI:10.1128 / JVI.78.19.10213-10220.2004

Hagbom M. Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog.* 2011;7:e11002115.

Greenberg, H. B., & Estes, M. K. (2009). Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*, 136(6),1939-1951. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.0>

Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M. A., Greenberg, H. B., O’Ryan, M., Kang, G., Desselberger, U., & Estes, M. K. (2017). Rotavirus infection. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17083. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>

Dormitzer Philip R., Zhen - Yu J. SunGerhard Wagner, Stephen C. Harrison. 2002. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *The EMBO Journal*.21:885-889

Hu, L., Ramani, S., Czako, R. *et al.* Structural basis of glycan specificity in neonate-specific bovine-human reassortant rotavirus. *Nat Commun*6, 8346 (2015).

Huang, Ming Xia, Ming Tan, Weiming Zhong, Chao Wei, Leyi Wang, Ardythe Morrow, Xi Jiang. Spike Protein VP8\* of Human Rotavirus Recognizes Histo-Blood Group Antigens

in a Type-Specific Manner. *Journal of Virology* Apr 2012, 86 (9) 4833-4843; DOI: 10.1128/JVI.05507-11

Pesavento, J.B. & Crawford, Sue & Estes, M.K. & Prasad, Bidadi. (2006). Rotavirus Proteins: Structure and Assembly. *Current topics in microbiology and immunology*. 309. 189-219. 10.1007/3-540-30773-7\_7.

Trask SD, Dormitzer PR. Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *J Virol*. 2006 Nov;80(22):11293-304. doi: 10.1128/JVI.01346-06. Epub 2006 Sep 13. PMID: 16971442; PMCID: PMC1642144.

Sue E. Crawford, Joseph M. Hyser, Budi Utama, Mary K. Estes. Rotavirus triggers calcium-activated autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Dec 2012, 109 (50) E3405-E3413; DOI:10.1073/pnas.1216539109

Sue E. Crawford & Mary K. Estes (2013) Viroporin-mediated calcium-activated autophagy, *Autophagy*, 9:5, 797-798, DOI: 10.4161/auto.23959

Hyser JM, Collinson-Pautz MR, Utama B, Estes MK. Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *mBio*. 2010;1(5).

Parr RD, Storey SM, Mitchell DM, McIntosh AL, Zhou M, Mir KD, *et al*. The rotavirus enterotoxin NSP4 directly interacts with the caveolar structural protein caveolin-1. *J. Virol*. 2006;80(6):2842–2854.

Long, CP y McDonald, SM (2017). Replicación del genoma del rotavirus: se requiere cierto ensamblaje. *Patógenos PLoS*, 13 (4), e1006242.

Brunet, J. P., N. Jourdan, J. Cotte-Laffitte, C. Linxe, M. Geniteau-Legendre, A. L. Servin, and A. M. Quero. 2000. Rotavirus infection induces cytoskeleton disorganization in human intestinal epithelial cells: implication of an increase in intracellular calcium concentration. *J. Virol*.

Lundgren, O., and L. Svensson. 2003. The enteric nervous system and infectious diarrhea, p. 51-68. In U. Desselberger and J. Gray (ed.), *Viral gastroenteritis*. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands.

Conner, M. E., and R. F. Ramig. 1997. Viral enteric diseases, p. 713-743. In N. Nathanson (ed.), *Viral pathogenesis*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.

Holmgren, J., Czerkinsky, C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 11, S45–S53 (2005). <https://doi.org/10.1038/nm1213>

McGhee JR, Fujihashi K (2012) Inside the Mucosal Immune System. *PLoS Biol* 10 (9): e1001397. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001397>

Xochihua Díaz L, Eusebio Angulo Castellanos, Ismael Francisco Herrera Benavente, Antonio Luévanos Velázquez, Mercedes Macías Parra, Abiel Mascareñas de los Santos, Sarbelio Moreno Espinosa, Federico Javier Ortiz Ibarra Brandon Ortiz Casas, Enrique Rodríguez Barragán, Napoleón González Saldañ. Impacto de la vacunación contra el rotavirus en México y América Latina: Realidades y nuevas perspectivas. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*. 2019; 32 (4): 145-156

Esparza-Aguilar, Marcelino, Bautista-Márquez, Aurora, González-Andrade, María del Carmen, & Richardson-López-Collada, Vesta Louise. (2009). Mortalidad por enfermedad diarreica en menores, antes y después de la introducción de la vacuna contra el rotavirus. *Salud Pública de México*, 51(4), 285-290. Recuperado en 05 de diciembre de 2020

INEGI. Características de las defunciones registradas en México durante 2017. Comunicado de Prensa Número 525/18, 31 de octubre del 1028, página 13.

Boletín Epidemiológico-Dirección General de Epidemiología de SS Número 30 | Volumen 36 | Semana 30 | Del 21 al 27 julio del 2019.

Braine T. Rotavirus vaccine introduction in Mexico sets precedent. *Bull World Health Organ* 2005;83:167.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006;12:304-306

Lee, S. y Baldrige, MT (2017). Interferón-lambda: un potente regulador de infecciones virales intestinales. *Fronteras en inmunología*, 8, 749. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00749>

Holloway G., Truong T. T., Coulson B. S. 2009; Rotavirus antagonizes cellular antiviral responses by inhibiting the nuclear accumulation of STAT1, STAT2, and NF-κB. *J Virol* 83:4942–4951

Jensen S., Thomsen A. R. 2012; Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J Virol* 86:2900–2910

Kato H., Takeuchi O., MikamoSatoh E., Hirai R., Kawai T., Matsushita K., Hiiragi A., Dermody T. S., Fujita T., Akira S. 2008; Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* 205:1601–1610

Sen A., Rothenberg M.E., Mukherjee G., Feng N., Kalisky T., Nair N., Johnstone I. M., Clarke M. F., Greenberg H. B. 2012; Innate immune response to homologous rotavirus infection in the small intestinal villous epithelium at single-cell resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:20667–20672

Franco, M. A., P. Lefevre, P. Willems, G. Tosser, P. Lintermanns, and J. Cohen. 1994. Identification of cytotoxic T cell epitopes on the VP3 and VP6 rotavirus proteins. *J. Gen. Virol.* 75:589-596.

Tate, J.E., Burton, A.H., Boschi-Pinto, C., Steele, A.D., Duque, J., Parashar, U.D., 2012. WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network, 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 12 (February (2)), 136–141.

Mowat, A. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331–341 (2003). <https://doi.org/10.1038/nri1057>

Hernández, P. P., Mahlakoiv, T., Yang, I., Schwierzeck, V., Nguyen, N., Guendel, F., Gronke, K., Ryffel, B., Hoelscher, C., Dumoutier, L., Renauld, J. C., Suerbaum, S., Staeheli, P., & Diefenbach, A. (2015). Interferon- $\lambda$  and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection. *Nature immunology*, 16(7), 698–707. <https://doi.org/10.1038/ni.3180>

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 1973 Dec 8;2(7841):1281-3. doi: 10.1016/s0140-6736(73)92867-5. PMID: 4127639.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Letter: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet.* 1973 Dec 29;2(7844):1497. doi: 10.1016/s0140-6736(73)92760-8. PMID: 4129337.

Sue E. Crawford, Joseph M. Hyser, Budi Utama, Mary K. Estes. Rotavirus triggers calcium-activated autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Dec 2012, 109 (50) E3405-E3413; DOI:10.1073/pnas.1216539109

Sue E. Crawford & Mary K. Estes (2013) Viroporin-mediated calcium-activated autophagy, *Autophagy*, 9:5, 797-798, DOI: 10.4161/auto.23959

Parra Avila M. H. 2004. Caracterización de linfocitos T CD4 específicos de rotavirus. Tesis de Doctorado. Pontificia Universidad Javeriana.

Fischer TK, Nielsen NM, Wohlfahrt J, Paerregaard A. Incidence and cost of rotavirus hospitalizations in Denmark. *Emerg Infect Dis.* 2007 Jun;13(6):855-9. doi: 10.3201/eid1306.061432. PMID: 17553223; PMCID: PMC2792867.

Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS, Jiang B, Glass RI. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis.* 2005 Sep 1;192 Suppl 1:S146-59. doi: 10.1086/431499. PMID: 16088798.

Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 2005 Jan-Feb;15(1):29-56. doi: 10.1002/rmv.448. PMID: 15484186.

Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol.* 2004 Dec;31(4):259-65. doi: 10.1016/j.jcv.2004.04.009. PMID: 15494266.

Böhm R, Fleming FE, Maggioni A, Dang VT, Holloway G, Coulson BS, von Itzstein M, Haselhorst T. Revisiting the role of histo-blood group antigens in rotavirus host-cell invasion. *Nat Commun.* 2015 Jan 5;6:5907. doi: 10.1038/ncomms6907. PMID: 25556995.

Hu, L., Ramani, S., Czako, R. *et al.* Structural basis of glycan specificity in neonate-specific bovine-human reassortant rotavirus. *Nat Commun* **6**, 8346 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms9346>

Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boirivant M, Galle PR, Strober W. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol.* 2001 Jan;22(1):21-6. doi: 10.1016/s1471-4906(00)01798-1. Erratum in: *Trends Immunol* 2001 Apr;22(4):225. PMID: 11286687.

Brandtzaeg P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine.* 2007 Jul 26;25(30):5467-84. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.12.001. Epub 2006 Dec 15. PMID: 17227687.

Dwivedy A, Aich P. Importance of innate mucosal immunity and the promises it holds. *Int J Gen Med.* 2011 Apr 12;4:299-311. doi: 10.2147/IJGM.S17525. PMID: 21556316; PMCID: PMC3085239.

Tezuka H, Ohteki T. Regulation of IgA Production by Intestinal Dendritic Cells and Related Cells. *Front Immunol.* 2019 Aug 13;10:1891. doi: 10.3389/fimmu.2019.01891. PMID: 31456802; PMCID: PMC6700333.

Lockhart A, Mucida D, Parsa R. Immunity to enteric viruses. *Immunity.* 2022 May 10;55(5):800-818. doi: 10.1016/j.immuni.2022.04.007. PMID: 35545029; PMCID: PMC9257994.

Wang L, Zhu L, Qin S. Gut Microbiota Modulation on Intestinal Mucosal Adaptive Immunity. *J Immunol Res.* 2019 Oct 3;2019:4735040. doi: 10.1155/2019/4735040. PMID: 31687412; PMCID: PMC6794961.

Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2007). *Kuby immunology.* Macmillan.

Abbas, Abul K., Pillai, Shiv, Lichtman, Andrew H.. (2013). *Basic immunology : functions and disorders of the immune system* (4th). Philadelphia:Elsevier Saunders.

Suárez LJ, Arboleda S, Angelov N, Arce RM. Oral Versus Gastrointestinal Mucosal Immune Niches in Homeostasis and Allostasis. *Front Immunol.* 2021 Jul 5;12:705206. doi: 10.3389/fimmu.2021.705206. PMID: 34290715; PMCID: PMC8287884.

Reboldi A, Arnon TI, Rodda LB, Atakilit A, Sheppard D, Cyster JG. IgA production requires B cell interaction with subepithelial dendritic cells in Peyer's patches. *Science.* 2016 May 13;352(6287):aaf4822. doi: 10.1126/science.aaf4822. PMID: 27174992; PMCID: PMC4890166.

Berin, M. C., & Chehade, M. (2010). Mucosal Immunology: An Overview. In *Pediatric Allergy: Principles and Practice Expert Consult: Second Edition* (pp. 471-476). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0271-2.00044-4>

Fan, S., Liao, Y., Lian, Y. *et al.* Role of innate lymphoid cells and dendritic cells in intradermal immunization of the enterovirus antigen. *npj Vaccines* **4**, 14 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0108-6>

Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang SY, Ko HJ, Vallance BA. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* 2018 Sep;39(9):677-696. doi: 10.1016/j.it.2018.04.002. Epub 2018 Apr 30. Erratum in: *Trends Immunol.* 2019 Feb;40(2):174. PMID: 29716793.

Goto Y. Epithelial Cells as a Transmitter of Signals From Commensal Bacteria and Host Immune Cells. *Front Immunol.* 2019 Aug 28;10:2057. doi: 10.3389/fimmu.2019.02057. PMID: 31555282; PMCID: PMC6724641.

Kong S, Zhang YH, Zhang W. Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids. *Biomed Res Int*. 2018 May 9;2018:2819154. doi: 10.1155/2018/2819154. PMID: 29854738; PMCID: PMC5966675.

Kobayashi, A., Donaldson, D., Erridge, C. *et al*. The functional maturation of M cells is dramatically reduced in the Peyer's patches of aged mice. *Mucosal Immunol* **6**, 1027–1037 (2013). <https://doi.org/10.1038/mi.2012.141>

Van Kaer L, Olivares-Villagómez D. Development, Homeostasis, and Functions of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes. *J Immunol*. 2018 Apr 1;200(7):2235-2244. doi: 10.4049/jimmunol.1701704. PMID: 29555677; PMCID: PMC5863587.

Cheroutre, H., Lambolez, F. & Mucida, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **11**, 445–456 (2011). <https://doi.org/10.1038/nri3007>

Sheridan BS, Lefrançois L. Intraepithelial lymphocytes: to serve and protect. *Curr Gastroenterol Rep*. 2010 Dec;12(6):513-21. doi: 10.1007/s11894-010-0148-6. PMID: 20890736; PMCID: PMC3224371.

Mayassi T, Jabri B. Human intraepithelial lymphocytes. *Mucosal Immunol*. 2018 Sep;11(5):1281-1289. doi: 10.1038/s41385-018-0016-5. Epub 2018 Apr 20. PMID: 29674648; PMCID: PMC6178824.

Qiu Y, Yang H. Effects of intraepithelial lymphocyte-derived cytokines on intestinal mucosal barrier function. *J Interferon Cytokine Res*. 2013 Oct;33(10):551-62. doi: 10.1089/jir.2012.0162. Epub 2013 May 21. PMID: 23692551.

McDonald BD, Jabri B, Bendelac A. Diverse developmental pathways of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2018 Aug;18(8):514-525. doi: 10.1038/s41577-018-0013-7. PMID: 29717233; PMCID: PMC6063796.

Vandereyken, M., James, O.J. & Swamy, M. Mechanisms of activation of innate-like intraepithelial T lymphocytes. *Mucosal Immunol* **13**, 721–731 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41385-020-0294-6>

Mora, J.R. Homing imprinting and immunomodulation in the gut: role of dendritic cells and retinoids. *Inflammatory Bowel Diseases* **14**, 275-89 (2008).

Ruth MR, Field CJ. The immune modifying effects of amino acids on gut-associated lymphoid tissue. *J Anim Sci Biotechnol*. 2013 Jul 30;4(1):27. doi: 10.1186/2049-1891-4-27. PMID: 23899038; PMCID: PMC3750756.

Kinnebrew MA, Pamer EG. Innate immune signaling in defense against intestinal microbes. *Immunol Rev*. 2012 Jan;245(1):113-31. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01081.x. PMID: 22168416; PMCID: PMC4624287.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015. PMID: 16497588.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):499-511. doi: 10.1038/nri1391. PMID: 15229469.

Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol*. 2000 Apr;67(4):508-14. doi: 10.1002/jlb.67.4.508. PMID: 10770283.

El-Zayat, S.R., Sibaii, H. & Mannaa, F.A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent* **43**, 187 (2019). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>

Wang S, Charbonnier LM, Noval Rivas M, Georgiev P, Li N, Gerber G, Bry L, Chatila TA. MyD88 Adaptor-Dependent Microbial Sensing by Regulatory T Cells Promotes Mucosal Tolerance and Enforces Commensalism. *Immunity*. 2015 Aug 18;43(2):289-303. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.014. Epub 2015 Jul 28. PMID: 26231118; PMCID: PMC4545404.

Yamamoto M, Takeda K. Current views of toll-like receptor signaling pathways. *Gastroenterol Res Pract*. 2010;2010:240365. doi: 10.1155/2010/240365. Epub 2010 Dec 14. PMID: 21197425; PMCID: PMC3010626.

Singh MV, Abboud FM. Toll-like receptors and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014 Sep 1;307(5):R501-4. doi: 10.1152/ajpregu.00194.2014. Epub 2014 Jun 11. PMID: 24920728; PMCID: PMC4214832.

Liu Y, Olganier D, Lin R. Host and Viral Modulation of RIG-I-Mediated Antiviral Immunity. *Front Immunol*. 2017 Jan 3;7:662. doi: 10.3389/fimmu.2016.00662. PMID: 28096803; PMCID: PMC5206486.

Rehwinkel J, Gack MU. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol*. 2020 Sep;20(9):537-551. doi: 10.1038/s41577-020-0288-3. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32203325; PMCID: PMC7094958.

Suárez, Raibel, & Buelvas, Neudo. (2015). El inflammasoma: mecanismos de activación. *Investigación Clínica*, 56(1), 074-099. Recuperado en 17 de abril de 2023, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0535-51332015000100009&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332015000100009&lng=es&tlng=es).

Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol*. 2006 Dec;7(12):1250-7. doi: 10.1038/ni1412. PMID: 17110941.

Schenk M, Bouchon A, Seibold F, Mueller C. TREM-1--expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel

diseases. *J Clin Invest.* 2007 Oct;117(10):3097-106. doi: 10.1172/JCI30602. PMID: 17853946; PMCID: PMC1974863.

Dinareello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol.* 2007 Nov;37 Suppl 1(Suppl 1):S34-45. doi: 10.1002/eji.200737772. PMID: 17972343; PMCID: PMC3140102.

Andrews C, McLean MH, Durum SK. Cytokine Tuning of Intestinal Epithelial Function. *Front Immunol.* 2018 Jun 5;9:1270. doi: 10.3389/fimmu.2018.01270. PMID: 29922293; PMCID: PMC5996247.

Mahapatro M, Erkert L, Becker C. Cytokine-Mediated Crosstalk between Immune Cells and Epithelial Cells in the Gut. *Cells.* 2021 Jan 9;10(1):111. doi: 10.3390/cells10010111. PMID: 33435303; PMCID: PMC7827439.

Spencer J, Sollid LM. The human intestinal B-cell response. *Mucosal Immunol.* 2016 Sep;9(5):1113-24. doi: 10.1038/mi.2016.59. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27461177.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The immune system in Health and Disease.* 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov/book/NBK10757>

Bányai K, Estes MK, Martella V, Parashar UD. Viral gastroenteritis. *Lancet.* 2018 Jul 14;392(10142):175-186. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31128-0. Epub 2018 Jun 29. PMID: 30025810; PMCID: PMC8883799.

Loo YM, Gale M Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity.* 2011 May 27;34(5):680-92. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.003. PMID: 21616437; PMCID: PMC3177755.

Burns JW, Krishnaney AA, Vo PT, Rouse RV, Anderson LJ, Greenberg HB. Analyses of homologous rotavirus infection in the mouse model. *Virology.* 1995 Feb 20;207(1):143-53. doi: 10.1006/viro.1995.1060. PMID: 7871723.

Desselberger U, Huppertz HI. Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *J Infect Dis.* 2011 Jan 15;203(2):188-95. doi: 10.1093/infdis/jiq031. PMID: 21288818; PMCID: PMC3071058.

Blutt SE, Conner ME. The gastrointestinal frontier: IgA and viruses. *Front Immunol.* 2013 Nov 28;4:402. doi: 10.3389/fimmu.2013.00402. PMID: 24348474; PMCID: PMC3842584.

Blutt SE, Miller AD, Salmon SL, Metzger DW, Conner ME. IgA is important for clearance and critical for protection from rotavirus infection. *Mucosal Immunol.* 2012 Nov;5(6):712-9. doi: 10.1038/mi.2012.51. Epub 2012 Jun 27. PMID: 22739233; PMCID: PMC3461240.

McNeal MM, Stone SC, Basu M, Bean JA, Clements JD, Hendrickson BA, Choi AH, Ward RL. Protection against rotavirus shedding after intranasal immunization of mice with a

chimeric VP6 protein does not require intestinal IgA. *Virology*. 2006 Mar 15;346(2):338-47. doi: 10.1016/j.virol.2005.11.016. Epub 2006 Jan 10. PMID: 16375942.

Doldan P, Dai J, Metz-Zumaran C, Patton JT, Stanifer ML, Boulant S. Type III and Not Type I Interferons Efficiently Prevent the Spread of Rotavirus in Human Intestinal Epithelial Cells. *J Virol*. 2022 Sep 14;96(17):e0070622. doi: 10.1128/jvi.00706-22. Epub 2022 Aug 24. PMID: 36000839; PMCID: PMC9472630.

Hernández PP, Mahlakoiv T, Yang I, Schwierzeck V, Nguyen N, Guendel F, Gronke K, Ryffel B, Hoelscher C, Dumoutier L, Renauld JC, Suerbaum S, Staeheli P, Diefenbach A. Interferon- $\lambda$  and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection. *Nat Immunol*. 2015 Jul;16(7):698-707. doi: 10.1038/ni.3180. Epub 2015 May 25. PMID: 26006013; PMCID: PMC4589158.

Pott J, Mahlaköiv T, Mordstein M, Duerr CU, Michiels T, Stockinger S, Staeheli P, Hornef MW. IFN-lambda determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 10;108(19):7944-9. doi: 10.1073/pnas.1100552108. Epub 2011 Apr 25. PMID: 21518880; PMCID: PMC3093475.

Ding S, Zhu S, Ren L, Feng N, Song Y, Ge X, Li B, Flavell RA, Greenberg HB. Rotavirus VP3 targets MAVS for degradation to inhibit type III interferon expression in intestinal epithelial cells. *Elife*. 2018 Nov 21;7:e39494. doi: 10.7554/eLife.39494. PMID: 30460894; PMCID: PMC6289572.

Álvarez Tello E. A. 2008. Evaluación de adyuvantes para inducir protección contra la infección por rotavirus en un modelo murino de vacunación intranasal. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Ingle H, Peterson ST, Baldrige MT. Distinct Effects of Type I and III Interferons on Enteric Viruses. *Viruses*. 2018 Jan 20;10(1):46. doi: 10.3390/v10010046. PMID: 29361691; PMCID: PMC5795459.

Hermant P, Michiels T. Interferon- $\lambda$  in the context of viral infections: production, response and therapeutic implications. *J Innate Immun*. 2014;6(5):563-74. doi: 10.1159/000360084. Epub 2014 Apr 17. PMID: 24751921; PMCID: PMC6741612

Osterlund PI, Pietilä TE, Veckman V, Kotenko SV, Julkunen I. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J Immunol*. 2007 Sep 15;179(6):3434-42. doi: 10.4049/jimmunol.179.6.3434. PMID: 17785777.

Odendall, C., Dixit, E., Stavru, F. *et al.* Diverse intracellular pathogens activate type III interferon expression from peroxisomes. *Nat Immunol* **15**, 717–726 (2014). <https://doi.org/10.1038/ni.2915>

Bender S, Reuter A, Eberle F, Einhorn E, Binder M, Bartenschlager R. Activation of Type I and III Interferon Response by Mitochondrial and Peroxisomal MAVS and Inhibition by

Hepatitis C Virus. PLoS Pathog. 2015 Nov 20;11(11):e1005264. doi: 10.1371/journal.ppat.1005264. PMID: 26588843; PMCID: PMC4654527.

Ma H, Qiu Y, Yang H. Intestinal intraepithelial lymphocytes: Maintainers of intestinal immune tolerance and regulators of intestinal immunity. J Leukoc Biol. 2021 Feb;109(2):339-347. doi: 10.1002/JLB.3RU0220-111. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32678936; PMCID: PMC7891415.

Broggi A, Granucci F, Zanoni I. Type III interferons: Balancing tissue tolerance and resistance to pathogen invasion. J Exp Med. 2020 Jan 6;217(1):e20190295. doi: 10.1084/jem.20190295. PMID: 31821443; PMCID: PMC7037241.

Guzman-Holst A, Ortega-Barria E, Flores ÁA, Carreño-Manjarrez R, Constenla D, Cervantes-Apolinar MY. 15-year experience with rotavirus vaccination in Mexico: a systematic literature review. Hum Vaccin Immunother. 2021 Oct 3;17(10):3623-3637. doi: 10.1080/21645515.2021.1936859. Epub 2021 Jun 30. PMID: 34187326; PMCID: PMC8437458.

Gómez-Altamirano CM, Carrión-Falcón V. Epidemiological overview of rotaviral gastroenteritis and prevalence of intussusception in Mexico . Acta Pediatr Mex. 2019;40(2):59-64.

Birkhoff M, Leitz M, Marx D. Advantages of Intranasal Vaccination and Considerations on Device Selection. Indian J Pharm Sci. 2009 Nov-Dec;71(6):729–31. PMCID: PMC2846493.

O'Neal CM, Clements JD, Estes MK, Conner ME. Rotavirus 2/6 viruslike particles administered intranasally with cholera toxin, Escherichia coli heat-labile toxin (LT), and LT-R192G induce protection from rotavirus challenge. J Virol. 1998 Apr;72(4):3390-3. doi: 10.1128/JVI.72.4.3390-3393.1998. PMID: 9525668; PMCID: PMC109829.

McNeal MM, Rae MN, Bean JA, Ward RL. Antibody-dependent and -independent protection following intranasal immunization of mice with rotavirus particles. J Virol. 1999 Sep;73(9):7565-73. doi: 10.1128/JVI.73.9.7565-7573.1999. PMID: 10438846; PMCID: PMC104283.

Ellen E, Rollo, K, Prasanna Kumar, Nancy C, Reich, Jean Cohen, Juana Angel, Harry B. Greenberg, Riten Sheth, Joseph Anderson, Brian Oh, Scott J. Hempson, Erich R. Mackow, Robert D. Shaw; The Epithelial Cell Response to Rotavirus Infection<sup>1</sup>. *J Immunol* 15 October 1999; 163 (8): 4442–4452.

Dowling JW, Forero A. Beyond Good and Evil: Molecular Mechanisms of Type I and III IFN Functions. J Immunol. 2022 Jan 15;208(2):247-256. doi: 10.4049/jimmunol.2100707. PMID: 35017214.

Daffis S, Szretter KJ, Schriewer J, Li J, Youn S, Errett J, Lin TY, Schneller S, Zust R, Dong H, Thiel V, Sen GC, Fensterl V, Klimstra WB, Pierson TC, Buller RM, Gale M Jr, Shi PY,

Diamond MS. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*. 2010 Nov 18;468(7322):452-6. doi: 10.1038/nature09489. PMID: 21085181; PMCID: PMC3058805.

Wershil BK, Furuta GT. 4. Gastrointestinal mucosal immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Feb;121(2 Suppl):S380-3; quiz S415. doi: 10.1016/j.jaci.2007.10.023. PMID: 18241686.

Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Häcker G, Berking C, Hornung V, Endres S, Ruzicka T, Rothenfusser S, Hartmann G. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest*. 2009 Aug;119(8):2399-411. doi: 10.1172/JCI37155. Epub 2009 Jul 20. PMID: 19620789; PMCID: PMC2719920.

Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jan;21(1):13-25. doi: 10.1128/CMR.00022-07. PMID: 18202435; PMCID: PMC2223843.

Dunlevy, F; McElvaney, Noel G; Greene, Catherine (2010): TLR3 Sensing of Viral Infection. Royal College of Surgeons in Ireland. Journal contribution. <https://hdl.handle.net/10779/rcsi.10784585.v2>

Dowling JW, Forero A. Beyond Good and Evil: Molecular Mechanisms of Type I and III IFN Functions. *J Immunol*. 2022 Jan 15;208(2):247-256. doi: 10.4049/jimmunol.2100707. PMID: 35017214.

Burke JD, Young HA. IFN- $\gamma$ : A cytokine at the right time, is in the right place. *Semin Immunol*. 2019 Jun;43:101280. doi: 10.1016/j.smim.2019.05.002. Epub 2019 Jun 17. PMID: 31221552; PMCID: PMC7367502.

Kotenko SV, Rivera A, Parker D, Durbin JE. Type III IFNs: Beyond antiviral protection. *Semin Immunol*. 2019 Jun;43:101303. doi: 10.1016/j.smim.2019.101303. PMID: 31771761; PMCID: PMC7141597.

Donnelly RP, Kotenko SV. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J Interferon Cytokine Res*. 2010 Aug;30(8):555-64. doi: 10.1089/jir.2010.0078. PMID: 20712453; PMCID: PMC2925029.

Dowling JW, Forero A. Beyond Good and Evil: Molecular Mechanisms of Type I and III IFN Functions. *J Immunol*. 2022 Jan 15;208(2):247-256. doi: 10.4049/jimmunol.2100707. PMID: 35017214.

Daffis S, Szretter KJ, Schriewer J, Li J, Youn S, Errett J, Lin TY, Schneller S, Zust R, Dong H, Thiel V, Sen GC, Fensterl V, Klimstra WB, Pierson TC, Buller RM, Gale M Jr, Shi PY, Diamond MS. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family

members. *Nature*. 2010 Nov 18;468(7322):452-6. doi: 10.1038/nature09489. PMID: 21085181; PMCID: PMC3058805.

Wershil BK, Furuta GT. 4. Gastrointestinal mucosal immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Feb;121(2 Suppl):S380-3; quiz S415. doi: 10.1016/j.jaci.2007.10.023. PMID: 18241686.

Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Häcker G, Berking C, Hornung V, Endres S, Ruzicka T, Rothenfusser S, Hartmann G. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest*. 2009 Aug;119(8):2399-411. doi: 10.1172/JCI37155. Epub 2009 Jul 20. PMID: 19620789; PMCID: PMC2719920.

Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jan;21(1):13-25. doi: 10.1128/CMR.00022-07. PMID: 18202435; PMCID: PMC2223843.

Dunlevy, F; McElvaney, Noel G; Greene, Catherine (2010): TLR3 Sensing of Viral Infection. Royal College of Surgeons in Ireland. Journal contribution. <https://hdl.handle.net/10779/rcsi.10784585.v2>

Dowling JW, Forero A. Beyond Good and Evil: Molecular Mechanisms of Type I and III IFN Functions. *J Immunol*. 2022 Jan 15;208(2):247-256. doi: 10.4049/jimmunol.2100707. PMID: 35017214.

Burke JD, Young HA. IFN- $\gamma$ : A cytokine at the right time, is in the right place. *Semin Immunol*. 2019 Jun;43:101280. doi: 10.1016/j.smim.2019.05.002. Epub 2019 Jun 17. PMID: 31221552; PMCID: PMC7367502.

Kotenko SV, Rivera A, Parker D, Durbin JE. Type III IFNs: Beyond antiviral protection. *Semin Immunol*. 2019 Jun;43:101303. doi: 10.1016/j.smim.2019.101303. PMID: 31771761; PMCID: PMC7141597.

Donnelly RP, Kotenko SV. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J Interferon Cytokine Res*. 2010 Aug;30(8):555-64. doi: 10.1089/jir.2010.0078. PMID: 20712453; PMCID: PMC2925029.

Amimo JO, Raev SA, Chepngeno J, Mainga AO, Guo Y, Saif L, Vlasova AN. Rotavirus Interactions With Host Intestinal Epithelial Cells. *Front Immunol*. 2021 Dec 22;12:793841. doi: 10.3389/fimmu.2021.793841. PMID: 35003114; PMCID: PMC8727603.

Graff JW, Ettayebi K, Hardy ME. Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism.

PLoS Pathog. 2009 Jan;5(1):e1000280. doi: 10.1371/journal.ppat.1000280. Epub 2009 Jan 30. PMID: 19180189; PMCID: PMC2627925.

Di Fiore IJ, Holloway G, Coulson BS. Innate immune responses to rotavirus infection in macrophages depend on MAVS but involve neither the NLRP3 inflammasome nor JNK and p38 signaling pathways. *Virus Res.* 2015 Oct 2;208:89-97. doi: 10.1016/j.virusres.2015.06.004. Epub 2015 Jun 14. PMID: 26079065.

Atmar RL, Bernstein DI, Harro CD, Al-Ibrahim MS, Chen WH, Ferreira J, Estes MK, Graham DY, Opekun AR, Richardson C, Mendelman PM. Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness. *N Engl J Med.* 2011 Dec 8;365(23):2178-87. doi: 10.1056/NEJMoa1101245. PMID: 22150036; PMCID: PMC3761795.

Velázquez FR, Matson DO, Guerrero ML, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, Glass RI, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis.* 2000 Dec;182(6):1602-9. doi: 10.1086/317619. Epub 2000 Oct 23. PMID: 11069230.

Knipping K, Garssen J, van't Land B. An evaluation of the inhibitory effects against rotavirus infection of edible plant extracts. *Virology.* 2012 Jul 26;9:137. doi: 10.1186/1743-422X-9-137. PMID: 22834653; PMCID: PMC3439294.

Kuklin NA, Rott L, Darling J, Campbell JJ, Franco M, Feng N, Müller W, Wagner N, Altman J, Butcher EC, Greenberg HB. alpha(4)beta(7) independent pathway for CD8(+) T cell-mediated intestinal immunity to rotavirus. *J Clin Invest.* 2000 Dec;106(12):1541-52. doi: 10.1172/JCI10927. PMID: 11120761; PMCID: PMC381473.

Franco MA, Greenberg HB. Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology.* 1997 Nov 24;238(2):169-79. doi: 10.1006/viro.1997.8843. PMID: 9400590.

Ward RL. Possible mechanisms of protection elicited by candidate rotavirus vaccines as determined with the adult mouse model. *Viral Immunol.* 2003;16(1):17-24. doi: 10.1089/088282403763635410. PMID: 12725685.

Dennehy PH. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev.* 2008 Jan;21(1):198-208. doi: 10.1128/CMR.00029-07. PMID: 18202442; PMCID: PMC2223838.

Vesikari T. Rotavirus vaccination: a concise review. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Oct;18 Suppl 5:57-63. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03981.x. Epub 2012 Aug 6. PMID: 22882248.

Hanlon P, Hanlon L, Marsh V, Byass P, Shenton F, Hassan-King M, Jobe O, Sillah H, Hayes R, M'Boge BH, et al. Trial of an attenuated bovine rotavirus vaccine (RIT 4237) in Gambian infants. *Lancet.* 1987 Jun 13;1(8546):1342-5. doi: 10.1016/s0140-6736(87)90649-0. PMID: 2884455.

Kramarz P, France EK, Destefano F, Black SB, Shinefield H, Ward JI, Chang EJ, Chen RT, Shatin D, Hill J, Lieu T, Ogren JM. Population-based study of rotavirus vaccination and intussusception. *Pediatr Infect Dis J*. 2001 Apr;20(4):410-6. doi: 10.1097/00006454-200104000-00008. PMID: 11332666.

Block SL, Vesikari T, Goveia MG, Rivers SB, Adeyi BA, Dallas MJ, Bauder J, Boslego JW, Heaton PM; Pentavalent Rotavirus Vaccine Dose Confirmation Efficacy Study Group. Efficacy, immunogenicity, and safety of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine at the end of shelf life. *Pediatrics*. 2007 Jan;119(1):11-8. doi: 10.1542/peds.2006-2058. PMID: 17200266.

Padilla-Noriega L, Mendez-Toss M, Menchaca G, Contreras JF, Romero-Guido P, Puerto FI, *et al*. Antigenic and genomic diversity of human rotavirus VP4 in two consecutive epidemic seasons in Mexico. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1688-1692

Jiang V, Jiang B, Tate J, Parashar UD, Patel MM. Performance of rotavirus vaccines in developed and developing countries. *Hum Vaccin*. 2010 Jul;6(7):532-42. doi: 10.4161/hv.6.7.11278. PMID: 20622508; PMCID: PMC3322519.

Ward RL, McNeal MM. VP6: A candidate rotavirus vaccine. *J Infect Dis*. 2010 Sep 1;202 Suppl:S101-7. doi: 10.1086/653556. PMID: 20684688.

Lopez-Guerrero DV, Arias N, Gutierrez-Xicotencatl L, Chihu-Ampan L, González A, Pedroza-Saavedra A, Rosas-Salgado G, Villegas-Garcia JC, Badillo-Godinez O, Fernandez G, Lopez S, Esquivel-Guadarrama F. Enhancement of VP6 immunogenicity and protective efficacy against rotavirus by VP2 in a genetic immunization. *Vaccine*. 2018 May 24;36(22):3072-3078. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.03.104. Epub 2017 Apr 29. PMID: 28465094.

Pastor AR, Rodríguez-Limas WA, Contreras MA, Esquivel E, Esquivel-Guadarrama F, Ramírez OT, Palomares LA. The assembly conformation of rotavirus VP6 determines its protective efficacy against rotavirus challenge in mice. *Vaccine*. 2014 May 19;32(24):2874-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.02.018. Epub 2014 Feb 25. PMID: 24583002.

Tamminen K, Heinimäki S, Gröhn S, Blazevic V. Internalization and antigen presentation by mouse dendritic cells of rotavirus VP6 preparations differing in nanostructure. *Mol Immunol*. 2020 Jul;123:26-31. doi: 10.1016/j.molimm.2020.04.001. Epub 2020 May 7. PMID: 32388275.

Badillo-Godinez O, Gutierrez-Xicotencatl L, Plett-Torres T, Pedroza-Saavedra A, Gonzalez-Jaimes A, Chihu-Ampan L, Maldonado-Gama M, Espino-Solis G, Bonifaz LC, Esquivel-

Guadarrama F. Targeting of rotavirus VP6 to DEC-205 induces protection against the infection in mice. *Vaccine*. 2015 Aug 20;33(35):4228-37. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.080. Epub 2015 Apr 4. PMID: 25850020.

Choi AH, Basu M, McNeal MM, Flint J, VanCott JL, Clements JD, Ward RL. Functional mapping of protective domains and epitopes in the rotavirus VP6 protein. *J Virol*. 2000 Dec;74(24):11574-80. doi: 10.1128/jvi.74.24.11574-11580.2000. PMID: 11090155; PMCID: PMC112438.

Baños DM, Lopez S, Arias CF, Esquivel FR. Identification of a T-helper cell epitope on the rotavirus VP6 protein. *J Virol*. 1997 Jan;71(1):419-26. doi: 10.1128/JVI.71.1.419-426.1997. PMID: 8985366; PMCID: PMC191067.

Yin Z, Dai J, Deng J, Sheikh F, Natalia M, Shih T, Lewis-Antes A, Amrute SB, Garrigues U, Doyle S, Donnelly RP, Kotenko SV, Fitzgerald-Bocarsly P. Type III IFNs are produced by and stimulate human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2012 Sep 15;189(6):2735-45. doi: 10.4049/jimmunol.1102038. Epub 2012 Aug 13. PMID: 22891284; PMCID: PMC3579503.

Ye L, Schnepf D, Staeheli P. Interferon- $\lambda$  orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2019 Oct;19(10):614-625. doi: 10.1038/s41577-019-0182-z. Epub 2019 Jun 14. PMID: 31201377.

Bhushal S, Wolfsmüller M, Selvakumar TA, Kemper L, Wirth D, Hornef MW, Hauser H, Köster M. Cell Polarization and Epigenetic Status Shape the Heterogeneous Response to Type III Interferons in Intestinal Epithelial Cells. *Front Immunol*. 2017 Jun 12;8:671. doi: 10.3389/fimmu.2017.00671. PMID: 28659914; PMCID: PMC5467006.

Lin JD, Feng N, Sen A, Balan M, Tseng HC, McElrath C, Smirnov SV, Peng J, Yasukawa LL, Durbin RK, Durbin JE, Greenberg HB, Kotenko SV. Distinct Roles of Type I and Type III Interferons in Intestinal Immunity to Homologous and Heterologous Rotavirus Infections. *PLoS Pathog*. 2016 Apr 29;12(4):e1005600. doi: 10.1371/journal.ppat.1005600. Erratum in: *PLoS Pathog*. 2016 Jun 15;12(6):e1005726. PMID: 27128797; PMCID: PMC4851417.

Rauch I, Rosebrock F, Hainzl E, Heider S, Majoros A, Wienerroither S, Strobl B, Stockinger S, Kenner L, Müller M, Decker T. Noncanonical Effects of IRF9 in Intestinal Inflammation: More than Type I and Type III Interferons. *Mol Cell Biol*. 2015 Jul;35(13):2332-43. doi: 10.1128/MCB.01498-14. Epub 2015 Apr 27. PMID: 25918247; PMCID: PMC4456449.

Anggraeni R, Ana ID, Wihadmadyatami H. Development of mucosal vaccine delivery: an overview on the mucosal vaccines and their adjuvants. *Clin Exp Vaccine Res*. 2022 Sep;11(3):235-248. doi: 10.7774/cevr.2022.11.3.235. Epub 2022 Sep 30. PMID: 36451668; PMCID: PMC9691869.

Jaimes\_MC, OlgaLucía Rojas, AnaMaría González, Isabela Cajiao, Annie Charpilienne, Pierre Pothier, Evelyne Kohli, HarryB. Greenberg, ManuelA. Franco, Juana Angel. Frequencies of Virus-Specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes Secreting Gamma Interferon after Acute Natural Rotavirus Infection in Children and Adults *Journal of Virology* May 2002, 76 (10) 4741-4749; DOI: 10.1128/JVI.76.10.4741-4749.2002

Hermant P, Michiels T. Interferon- $\lambda$  in the context of viral infections: production, response and therapeutic implications. *J Innate Immun.* 2014;6(5):563-74. doi: 10.1159/000360084. Epub 2014 Apr 17. PMID: 24751921; PMCID: PMC6741612.

Grimwood K, Lambert SB, Milne RJ. Rotavirus infections and vaccines: burden of illness and potential impact of vaccination. *Paediatr Drugs.* 2010 Aug 1;12(4):235-56. doi: 10.2165/11537200-000000000-00000. PMID: 20593908.

Autenrieth IB, Bucheler N, Bohn E, Heinze G, Horak I. Cytokine mRNA expression in intestinal tissue of interleukin-2 deficient mice with bowel inflammation. *Gut.* 1997 Dec;41(6):793-800. doi: 10.1136/gut.41.6.793. PMID: 9462212; PMCID: PMC1891612.

Feng CG, Zheng L, Jankovic D, Báfica A, Cannons JL, Watford WT, Chaussabel D, Hieny S, Caspar P, Schwartzberg PL, Lenardo MJ, Sher A. The immunity-related GTPase Irgm1 promotes the expansion of activated CD4<sup>+</sup> T cell populations by preventing interferon-gamma-induced cell death. *Nat Immunol.* 2008 Nov;9(11):1279-87. doi: 10.1038/ni.1653. Epub 2008 Sep 21. PMID: 18806793; PMCID: PMC2580721.

O'Neal CM, Harriman GR, Conner ME. Protection of the villus epithelial cells of the small intestine from rotavirus infection does not require immunoglobulin A. *J Virol.* 2000 May;74(9):4102-9. doi: 10.1128/jvi.74.9.4102-4109.2000. PMID: 10756022; PMCID: PMC111924.

Youngman KR, Franco MA, Kuklin NA, Rott LS, Butcher EC, Greenberg HB. Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response. *J Immunol.* 2002 Mar 1;168(5):2173-81. doi: 10.4049/jimmunol.168.5.2173. PMID: 11859103.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación  
Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 20 de abril de 2023.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**

Encargada de Despacho de la Dirección  
De la Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Análisis de los mecanismos de protección contra la infección por rotavirus en un modelo murino de vacunación intranasal**", que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Giovanna Iveth Juárez Popoca. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

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

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

**A t e n t a m e n t e**

**Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ** | Fecha:2023-05-25 18:20:46 | Firmante

nvretuOjjic5TpHDep8wz9HL3uE8Y2h+KctpFKVHBVzNucTSlJoxlo8B7svUDWqNKhH7HKVn71SreaxtYkKri2PPyVEtR5BEIRf0FqlmtkUpTq4m519VFkKlkpq/amlenHY+53ljCxAW0Uoo+GYwF9gkJY48QuSf7b6RjyTOg4xAJLWaQVGRYRev6M5hp6cfXEflh/ExXV1nqhatllgM4FtjJh6nBfw1F7vCsT3ey5i7HI5C+LBVT6/nrk2PW4Gz2QwT5b1rocNlsHGI2YX/UrdUQhLkeuG1Xg5gS2qnfwrRxfXlviChld4c+8KQbl5vg9wM/DxOyOTOkd7/C1/7pA==

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



[JmPtbs678](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vqFyYNBA6lftfNPDttEFet0St3CPNiSU>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación  
Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 20 de abril de 2023.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**

Encargada de Despacho de la Dirección  
De la Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Análisis de los mecanismos de protección contra la infección por rotavirus en un modelo murino de vacunación intranasal**", que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Giovanna Iveth Juárez Popoca. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

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

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

**A t e n t a m e n t e**

**Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2023-05-25 17:01:16 | Firmante

jhHMsS3tXPAGaZBIXrAxOe+zopJpagQ2rHJaG/Fx1BIK4yy7aFmSuccoQs5oCLWS2pAVwh3ImJotH9g/q2ZB7tNb6cT9lfjYcefRoE9GkpcOwVjR9ag0+iwOTdtdCzqgQW7lyVAQG MizPqP6l/T1d6AaMM1XsEly7x9ITy62kW/aORrcOCKxG+ tqi207+Ri36ZLdZak+PVQcY9usPRsRra8Yys4ktFQoniDji46NrSTYBo02KWQ05nMsdasN4/lezRMH3X+21ubEA5Jh7o S2M7tzKmJurOU4KmpNmuN5S5DAmP9MWN+M/38Ackgpird/46LfyFgOa3Cf0VQjkW61A==

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



**FOHZX7GVy**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/nLjtPtPJ4EEvGlp0q1sw5251dgsVmtqB>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación  
Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 20 de abril de 2023.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**

Encargada de Despacho de la Dirección  
De la Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Análisis de los mecanismos de protección contra la infección por rotavirus en un modelo murino de vacunación intranasal**", que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Giovanna Iveth Juárez Popoca. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

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

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

**A t e n t a m e n t e**

**Dr. José Luis Montiel Hernández**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

JOSE LUIS MONTIEL HERNANDEZ | Fecha:2023-05-25 15:20:39 | Firmante

cPv8Zv28X9UPx8XmseNOnvejsdANd/s0B82wvpmz5XL3AIXNyJL2NqC+ouurNiyJwOgxXAL24UimEgn4MqHCknv+1dTgdS+kTODICWUE7RcjdkzNBKkHpJQRC1W5cvbl3xeN  
xQtvau4y5xplSbvPFmjENN+I4Z7NUxZgMQ6Wg+dgn3d4N2oQjH0bCs5mTlgzBPk55dgTWC35+fMMaxH9VB3rti+PLHUbX9jlyuS2FhCnukk8eTghGtRRYfjNA2J/mF3afk5WEqBx/  
2+2a6BPcyQezlBC/PqFeGpHyfXxAfPEhCxwLcTKkAITfzCEQUZfWP84yzFDblAmIO76hrkQ==

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



[Lkf1nKHG](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/d688kGRsk74MJkz6pdC9ivYz2KwQS4v>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación  
Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 20 de abril de 2023.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**

Encargada de Despacho de la Dirección  
De la Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Análisis de los mecanismos de protección contra la infección por rotavirus en un modelo murino de vacunación intranasal**", que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Giovanna Iveth Juárez Popoca. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

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

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

**A t e n t a m e n t e**

**Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2023-05-25 19:56:46 | Firmante**

IKqFW17aWorLalezqtYEvI9mRI4ceguEE0Q1Wl6xKnRH7/6fB5alH4iHsFr0uztkvLLR8dutq3gwJyWy3ct+0CBy5v8n5sZlxTDDagHld9UUBEVObQz3S3EsC8FNLexYg2Jtd4SedEUh630jlABazsE9uE//CH1mst3Xleo2hr9SfBmhTwB1eyCYpudH9aFHw1w3WkltGJqomqYqDFAkejTGftWNnZWGwwmgBaVob3gAoKH9ea1ImuRNt/FNgEb4vRE5afmPE8eumLFsqXVsbBizY2O+RY96czoOq6KE4Lcr33JQO+UCUggzveD1aO/sdZowjME4s37NdzLzn+AVw==

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



[GEUPhHtdr](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JhoX6yl93kz3PmSomcEPEDSedTzM0qP6>

