UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE MEDICINA

PAPEL DE LA INTEGRINA α4β7 EN LA PROTECCIÓN CONTRA LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS EN UN MODELO MURINO DE VACUNACION INTRANASAL CON UN PEPTIDO SINTETICO DE VP6

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN MEDICINA MOLECULAR

QUE PRESENTA:
BIOL. MARIANA BRAVO VIZUETT

DIRECTOR DE TESIS
DR. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA

Cuernavaca, Morelos, México a 11 de Febrero 2025

Agradecimientos

Todo lo que hago y todo lo que siempre hare será para ti, me conmueve saber que estarás de mi lado en cada etapa, todo es por ti, un avance o una decisión, siempre estoy a un paso de llegar al lugar en donde debo estar.

Gracias Dios por absolutamente todo.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio, así también como a mis Tutores la Dr. Vanessa y el Dr. Fernando por tenerme paciencia.

Me agradezco a mi por tomar el control de mis decisiones y mi esfuerzo, de no haber confiado no terminaría nada.

Resumen

Estudios en ratones han demostrado que una inmunización intranasal con el péptido 289-302 de la proteína VP6 del rotavirus, que representa un epítopo de células Th, induce una respuesta inmunitaria protectora contra una infección por RV en el intestino delgado, que depende de células de tipo Th. Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los que las células Th específicas del epítopo en la mucosa nasal se desplazan a la mucosa intestinal. El objetivo de este estudio es determinar si, tras la inmunización i.n, las células Th específicas del péptido positivas para el receptor intestinal α4β7 viajan a los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN), y si este receptor participa en la protección. Los ratones BABL/c fueron inmunizados i.n. dos veces con el péptido VP6289-302 en presencia de toxina del cólera. Tras la última inmunización, en un grupo de ratones se evaluó por citometría de flujo la presencia de células Th de memoria específicas del péptido que expresaban CD69 y α4β7 en los MLN. Otro grupo de ratones fue desafiado con un RV murino y tratado con un mAb bloqueante anti-α4β7, y se comparó la carga viral en heces. Se observó que tras la inmunización i.n., las células Th α4β7+ CD69+ con memoria específica de péptido estaban presentes en el MLN, y el mAb anti-α4β7 indujo un aumento de la carga viral en comparación con el control. Sin embargo, no se logró esclarecer con firmeza un rol significativo ante la inoculación del mAb anti-α4β7, como se esperaba al inicio del estudio.

Estos resultados demuestran que la inmunización i.n. induce células Th específicas del péptido α4β7+ que se desplazan a la mucosa intestinal para proteger frente a la infección.

Índice

1. Introducción…….…….....6
1.1 Rotavirus.…….…….6
1.1.1 Generalidades …….....6
1.1.2 Estructura.…….…….6
1.1.3 Ciclo de Replicación …….....8
1.2 Epidemiología.…….....10
1.3 Vacunas ……..10
2. Respuesta inmune ……11
2.1 Respuesta inmune innata…….…….11
2.2 Respuesta inmune adaptativa …….…….12
2.3 Respuesta inmune de la mucosa intestinal ……..……..13
2.4 Receptores de direccionalidad a mucosa intestinal ……14
2.5 Respuesta inmune contra Rotavirus ……..……..15
3. Antecedentes …….…….16
4. Planteamiento del Problema…….....17
5. Justificación ……18
6. Objetivos …….…….20
7. Hipótesis……21
8. Materiales y métodos ……22
9. Resultados ……..27
9.1 Producción y purificación del anticuerpo monoclonal DATK32 anti- α4β7 ..27
9.2 Determinación de células Th de memoria que expresen α4β7 inducidas tras dos inmunizaciones intranasales con el péptido sintético de $VP6_{289-302}$, provenientes de Bazo, GLM, Placas de Peyer…….29
9.3 Papel del receptor de direccionalidad α4β7 en la protección inducida contra la infección por la vacuna i.n con el péptido VP6 289-302…….…..33
10. Discusión……..…37
11. Conclusión…….…….41
12. Referencias Bibliográficas…….43

Acrónimos

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

RV: Rotavirus
PAHO: Pan American Health Organization
RNA: Ribonucleic acid
VP: proteínas estructurales
NSP: proteínas no estructurales
HBGA : Histo-blood group antigens
PDC: partícula de doble capa
células NK: Natural killer
PAMP´s: Pathogen associated molecular patterns
DNA: Deoxyribonucleic acidTLR: receptores tipo Toll
RIG-I/MDA-5: receptors de reconocimiento de patrones citoplasmáticos
IFN: interferons
MHC: Major Histocompatibility Complex
Th: Células T cooperadoras
Tc: Células T citotóxicas
BCR: Molécula de inmunoglobulina que está en linfocitos B y reconoce antígenos
MALT:Mucosal-associated lymphoid tissue
CPA: células presentadoras de antígeno
NALT:Nasal-associated lymphoid tissue
BALT: Bronchial-associated lymphoid tissue
GALT:Gut-associated lymphoid tissue
PP: Placas de Peyer
GLM: ganglio linfático mesentérico
LIE: Linfocitos intraepiteliales
LP: Lamina Propria
CCR9: receptor de quimiocina
IgA: anticuerpos neutralizantes
MAdCAM-1: Mucosal Addresin Cell Adhesion
$VP6_{289-302:}$ péptido sintético
α4β7 integrina: receptor de direccionalidad
DATK32: hibridoma de rata anti- α4β7
i.n.: intranasal
EDIM: diarrea epizoótica de ratones infantes
FTY720: Fingolimod fármaco

Índice Tablas

1. Resumen de las diferentes purificaciones el Acm anti- α4β7 a partir de ascites…**…….28**

Índice Figuras

1. Estructura de rotavirus…….…….8
2. El ciclo de replicación del rotavirus……..……...9
3. Absorbancia de las fracciones obtenidas en la purificación del anticuerpo anti α4β7…….……...28
4. Determinación de la integridad de anticuerpo HB 294 anti-α4β7…….29
5. Datos de citometría de flujo que indican α4β7 comercial / α4β7 Ab monoclonal purificado de ratón……..30
6. Efecto de la inmunización con VP6 $_{289-302}$ en células de ratones marcadas con el Acm anti-α4β7 extraídas después de las inmunizaciones…….……32
7. Efecto de la administración del Acm anti- α4β7 en ratones inmunizados con el péptido sintético de VP6 289-302 + Toxina de colera como adyuvante. ……35
8. Efecto de la administración del fármaco FTY720 en ratones inmunizados con el péptido sintético de VP6 289-302 + Toxina de colera como adyuvante…….…….36

1. INTRODUCCION

1.1 ROTAVIRUS

1.1.1 GENERALIDADES

Rotavirus (RV) es el principal agente causante de gastroenteritis en niños menores de 5 años en todo el mundo. RV causa una infección en la que los síntomas incluyen diarreas abundantes, vomito, fiebre y malestar general que lleva a un estado de deshidratación importante en niños, que puede requerir hospitalización y en algunos casos conducir a la muerte. El virus puede también afectar a personas de la tercera edad (60>) o pacientes inmunodeprimidos, en el que la infección puede ser más severa. [1,2]

El RV humano fue descrito por primera vez por Bishop *et al*. En 1973, en biopsias duodenales y muestras fecales extraídas de infantes humanos con diarrea aguda. Antes de la introducción de las vacunas contra RV en el 2006, un aproximado entre 55,000 y 70,000 niños eran hospitalizados cada año en EE.UU. debido a infecciones con (OPS Rotavirus). Después de la introducción de las vacunas, la morbilidad y mortalidad provocada por este virus disminuyó drásticamente. Sin embargo, a pesar del uso de las vacunas RV sigue provocando alrededor de 200,000 muertes en todo el mundo al año, principalmente en países de bajos ingresos en Africa y sur de Asia.

1.1.2 ESTRUCTURA

RV es un virus con un genoma constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena. Las partículas virales o viriones tienen forma icosaédrica con aproximadamente 75 nanómetros de diámetro y no tiene envoltura lipídica.

El genoma viral codifica para 12 proteínas; 6 proteínas estructurales (VP) que conforman al virión y 6 proteínas no estructurales (NSP) que solamente están presentes en la célula infectada y participan en la morfogénesis y replicación del virus.

El virión está constituido por 3 capas concéntricas de proteínas. La capa más interna se compone de 60 dímeros de VP2 (102 kDa), que engloban a los 11 segmentos de RNA de doble cadena, los cuales están asociados a la polimerasa viral VP1 (125 kDa) y la guaniniltransferasa VP3 (88 kDa). La capa intermedia está constituida por 260 trímeros de VP6 (45 kda), que hacen contacto con VP2 por su lado interno y con las proteínas de la capa externa VP4 (87 kDa) y VP7 (37 kDa). El piso de la capa externa está formado por 780 copias de la glicoproteína VP7, donde se insertan dímeros de la proteína VP4 a manera de espículas. Figura (1)

RV se clasifica en 7 grupos (A-G) con base en el reconocimiento serológico de VP6. Los grupos A, B, C están relacionados con humanos y animales, siendo el grupo A el más común y el de mayor importancia epidemiológica en humanos. Las proteínas externas VP7 y VP4 son los blancos de los anticuerpos neutralizantes y definen los serotipos.[3] VP7 define el serotipo G y VP4 el serotipo P. Sin embargo, en la actualidad también se ha utilizado la clasificación de genotipos, con base en la secuencia de bases de los genes que codifican para estas proteínas. En la actualidad, dentro del grupo de rotavirus A se han reportado 42 genotipos G y 58 genotipos P, tanto en rotavirus que infectan al humano como otros animales. [4]

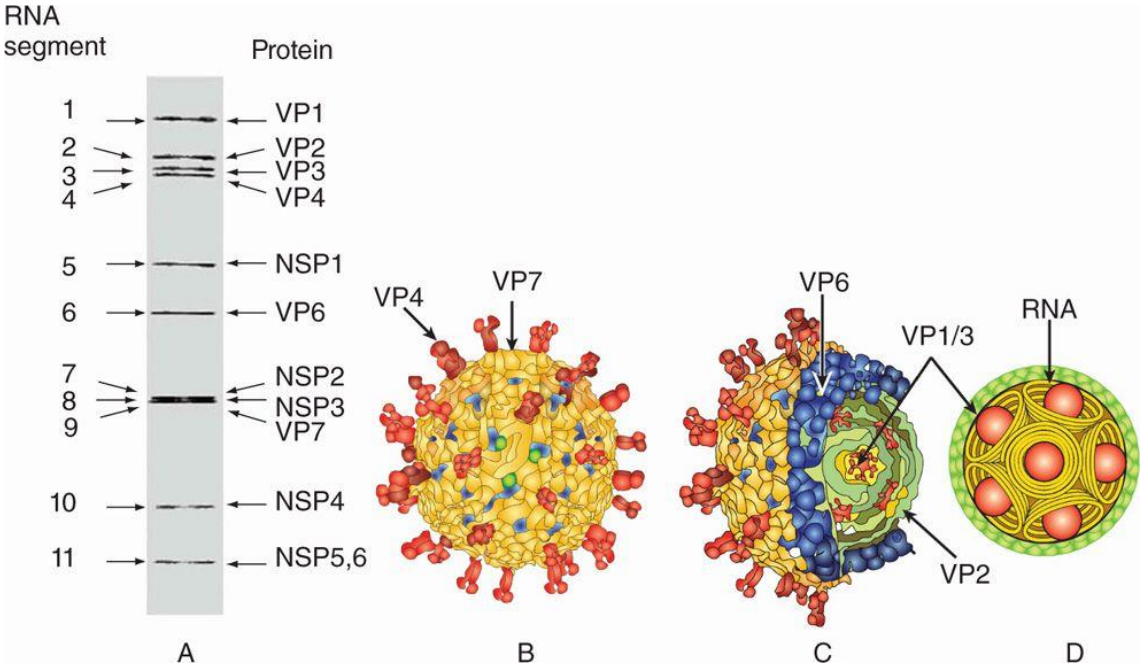


Figura 1. Estructura de rotavirus (A) 11 segmentos de rotavirus, cada segmento codifica las proteínas estructurales (VPI-VP7) o no estructurales (NSPI-NSP6) correspondientes, (B) la estructura del rotavirus que muestra las proteínas de la cápside de la capa externa, incluidas VP4 y VP7 (C). (Tomado 15 virus de la diarrea | Clave básica médica (basicmedicalkey.com) BVV Prasad).

1.1.3 CICLO DE REPLICACION

RV infecta a los enterocitos maduros de las puntas de las vellosidades del intestino delgado, provocando una alteración en la absorción, transporte de agua y electrolitos, provocando así un cuadro de diarrea agudo que puede conducir a una en deshidratación severa e incluso la muerte en infantes humanos.[5] Como resultado de la gran cantidad de viriones liberados en la diarrea, el RV puede ser transmitido fácilmente por la vía fecal-oral.

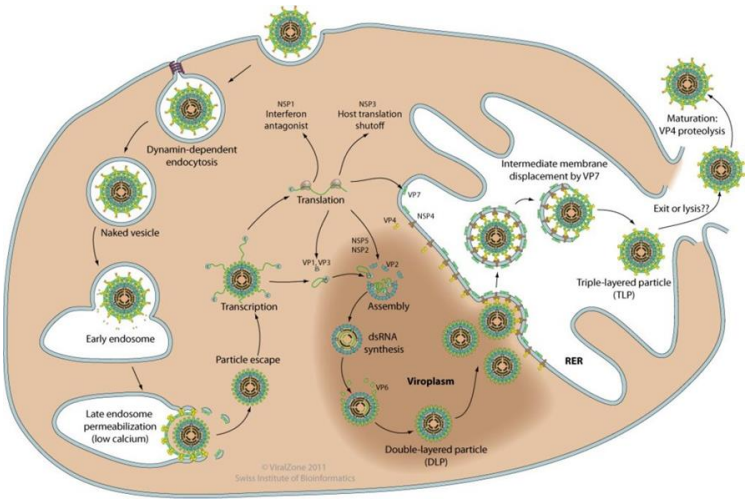


Figura 2. El ciclo de replicación del rotavirus (Borodavka *et al*., 2021)

Para que RV sea infectivo, la proteína externa VP4 necesita ser escindida por la tripsina presente en el intestino. Este corte genera dos fragmentos; VP5 y VP8. Estos fragmentos se rearreglan y forman una estructura de tallo y cabeza. El tallo está constituido por VP5, que es el fragmento más proximal a la capa externa del virión, constituido por VP7 y VP8 forma la cabeza o la región globular de la molécula.

La infección inicia cuando VP8 enlaza al ácido siálico o a glicanos del HBGA (del inglés “Histo-blood group antigens”) presentes en la membrana de las células blanco. Posteriormente, Tanto VP7 como VP5 interaccionan de manera secuencial con receptores presentes en la membrana, celular entre los que se encuentran las integrinas α2β1, αVβ3 y αXβ2, y la proteína de choque térmico Hsc70 (Figura 2).[6] Dependiendo de la cepa, el RV ingresa a las células por medio de endosomas que pueden ser clatrina y dinamina dependientes ó clatrina independientes y caveolina dependientes. Por un mecanismo no definido, en el endosoma la capa externa viral se desensambla y la partícula de doble capa (PDC) es exportada al citosol celular. En este compartimiento la PDC transcribe los RNA mensajeros virales y las proteínas sintetizadas forman una estructura llamada viroplasma, donde se lleva a cabo la replicación del genoma y la morfogénesis viral. El nuevo genoma es envuelto por las dos primeras capas proteica para formar nuevas PDC que son translocadas del viroplasma al interior del retículo endoplásmico por medio de la interacción con NSP4. En este proceso

la PDC adquiere VP7 y VP4 para formar viriones completos, pero con membrana. Esta membrana desaparece después de unos 10 min y da lugar a la partícula de tres capas madura. Los nuevos virus son expulsados al lumen intestinal con la lisis celular o por transporte exocítico vesicular. [7]

1.2 EPIDEMIOLOGIA

La enfermedad conocida como diarreica aguda (EDA) el 50% de estos casos en niños menores de 5 años están asociados por rotavirus.[8] El RV es la causa más frecuente de gastroenteritis grave tanto en países en desarrollo como en desarrollados. Cada año hay un estimado de 111 millones de casos de diarrea relacionados con el rotavirus, 25 millones de consultas ambulatorias, 2 millones de hospitalizaciones y 440 000 muertes, don el 82% de las muertes ocurren en países en desarrollo. [9]

El pico de incidencia de la enfermedad grave por rotavirus ocurre antes en los países de alta mortalidad que en los países con baja mortalidad; se estima que el 43% de todas las hospitalizaciones por rotavirus en niños menores de cinco años ocurren a los ocho meses de edad en África, en comparación con el 27% en Europa. [10]

1.3 VACUNAS

En una necesidad de aminorar la tasa de mortalidad infantil producida por rotavirus en 2006 se aprobaron dos vacunas a nivel mundial contra la infección por RV en infantes; Rotarix (GlaxoSmithKline) y Rotateq (Merck). Rotarix se basa en una cepa humana atenuada con el serotypo G1 y genotipo [P8], la cual se administra en dos dosis orales. Rotateq es el resultado de un proceso de recombinación genética in vitro entre una cepa bovina WC3 y varias cepas de rotavirus humano, lo cual genero 4 virus rearreglantes con los serotipos G1, G2, G3 y G4 y el genotipo [P8], y se aplica oralmente en 3 dosis. Ambas vacunas inducen una protección contra la patología arriba del 90%, por lo que ha contribuido a reducir drásticamente la mortalidad infantil provocada por la

infección por RV a nivel mundial. Sin embargo, en países de bajos ingresos en África y Asia, las vacunas solamente inducen protección del 40-70%. [4]

Por esta razón, recientemente en el 2018 se aprobaron dos nuevas vacunas Rotavac (Bharat Biotech) y ROTASIIL (Serum institute of India). Rotavac es una vacuna basada en un virus humano atenuado de serotipo G9 y genotipo [P11] y ROTASIIL es una vacuna basada en rearreglantes entre RV bovinos y humanos con los serotipos G1, G2, G3, G4 y G9. Ambas vacunas han sido introducidas preferentemente en países de bajos ingresos.[11] Recientemente, se ha introducido Rotavin-M1 (Polivac; Centro de Investigación y Producción de Vacunas, Vietnam), que es una vacuna formada por una cepa única atenuada de rotavirus humano G1P[8], pero esta aún no ha sido autorizada por la OMS.

2 RESPUESTA INMUNE

2.1 RESPUESTA INMUNE INNATA

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra patógenos extraños dentro de organismo. Esta respuesta es inmediata y la exposición al antígeno no induce memoria inmunológica a largo plazo. Existen barreras anatómicas, químicas y celulares. Dentro de las barreras anatómicas se pueden mencionar a la piel y las mucosas. Las barreras químicas se componen de enzimas proteolíticas, sistema de complemento, pH del sistema digestivo, citocinas etc. Por otro lado, la barrera celular se compone de células fagocíticas como los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, y células citotóxicas como las células NK (Natural killer). Las tres barreras de la respuesta inmune innata funcionan en coordinación para controlar y eliminar la mayoría de los patógenos que atacan al organismo.

El sistema inmune innato tiene especificidad hacia diferentes antígenos, aunque esta especificidad no es tan alta como la presenta el sistema inmune adaptativo. Así, las células del sistema inmune innato tienen receptores que reconocen patrones moleculares en los patógenos o PAMP´s (del inglés “Pathogen associated molecular patterns”) como pueden ser el DNA, LPS, RNA de doble cadena etc. Estos receptores pueden ser solubles, asociados a la membrana

celular o intracelulares. Dentro de los receptores de membrana e intracelulares podemos mencionar a las receptores tipo Toll (TLR) y RIG-I/MDA-5 que reconocen una amplia variedad de PAMPs. La estimulación de estos receptores induce la producción de citocinas dentro de las cuales destacan los interferones (IFN) tipo I y III (IFN innatos) que ayudan a combatir a los patógenos. Finalmente, las células dendríticas juegan un papel fundamental conectando el sistema inmune innato con el adaptativo, ya que estas células presentan antígenos en el contexto de las moléculas del MHC a las células T.[12]

2.2 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

Las células encargadas de la inmunidad adaptativa son las células B y T, que, a diferencia de la respuesta inmune innata, pueden generar células de memoria, que en el segundo encuentro con el antígeno responden más rápido, de manera más potente y sostenida. Esta particularidad de la respuesta inmune adaptativa es la base de las vacunas.

Las células B son las encargadas de la producción de anticuerpos. Estas reconocen el antígeno de manera soluble o particulado por medio de su receptor de membrana (BCR) que en sí es una inmunoglobulina. El antígeno entrecruza varios receptores que señalizan para iniciar la proliferación y diferenciación a células de memoria o células plasmáticas productoras de anticuerpos. Estas últimas se alojan en los órganos linfoides secundarios o en médula ósea para secretar por largos periodos de tiempo las inmunoglobulinas

Las células T se dividen en dos grandes poblaciones; células T cooperadoras $CD4^+$ (Th) y células T citotóxicas $CD8^+$ (Tc). Las células Tc atacan y destruyen células infectadas con patógenos intracelulares o células tumorales. Reconocen antígeno en forma de péptidos de 8 a 10 aminoácidos asociados a las moléculas del MHC clase I, provenientes de proteínas citosólicas procesadas y presentadas por las células presentadoras de antígeno (CPA) o células blanco. Por otro lado, las células Th son esenciales en la proliferación y diferenciación de las células B y células Tc. Asimismo, reconocen antígeno en forma de péptidos de 14 a 25

aminoácidos asociados a las moléculas del MHC clase II provenientes de proteínas endocitadas por CPAs. [13]

2.3 RESPUESTA INMUNE DE MUCOSA INTESTINAL

La respuesta inmune de mucosas está organizada alrededor de tejido linfoide asociado mucosas (MALT del inglés “Mucosal-associated lymphoid tissue”). Dentro de las regiones anatómicas constituidas por mucosas se pueden mencionar el tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT del inglés “Nasal-associated lymphoid tissue”), tejido linfoide asociado a bronquios (BALT del inglés “Bronchial-associated lymphoid tissue”) y tejido linfoide asociado a intestino (GALT del inglés “Gut-associated lymphoid tissue). Aunque este sistema está conectado a la inmunidad periférica, es más eficiente la respuesta en las mucosas cuando la estimulación antigénica se da en las mismas. Por ejemplo, una estimulación antigénica en NATL genera la migración de células B y T al resto de las mucosas. En contraste, cuando la estimulación antigénica se da en la periferia, la respuesta a nivel de mucosas es limitada. Esto en parte se explica porque la estimulación antigénica en MALT induce la expresión de integrinas que funcionan como receptores de direccionalidad (homimg-receptors) hacia los diferentes tejidos de mucosas; un ejemplo es la integrina α4β7 y el receptor de quimiocina CCR9 que son necesarios para el ingreso de los linfocitos a GALT. [14]

El sistema inmune intestinal esta compartamentalizado en tejidos inductores de la respuesta inmune como las placas de Peyer (PP) y el ganglio linfático mesentérico (GLM), y tejido conjuntivo de respuesta efectora como la Lámina Propria (LP) y los linfocitos intraepiteliales (LIE). El ingreso del antígeno se da a través de las células M de las PP donde las células dendríticas captan al antígeno procesándolo y presentándolo en el contexto de moléculas del MHC tipo I o II a las células T. A su vez las células Th auxilian en la activación y proliferación de las células B. Las células T y B activadas expresan la integrina α4β7 y el receptor de la quimiocina TEK-25 CCR9 y migran hacia el GLM, para posteriormente migrar por linfa hasta el ducto torácico donde se integran a la

circulación sanguínea para sembrar los sitios efectores de las mucosas y en particular la LP y el compartimiento de los LIE para ejercer su función efectora. Alternativamente, el antígeno puede entrar a través de las células epiteliales intestinales y viajar al GLM donde los linfocitos B y T se activan y migran como se indicó anteriormente.[15]

2.4 RECEPTORES DE DIRECCIONALIDAD A MUCOSA INTESTINAL

La recirculación de linfocitos a través de diferentes órganos está regulada por moléculas de adhesión como las integrinas ("receptores homing") que reconocen ligandos específicos en las vénulas de endotelio alto (VEA) de los órganos linfoide secundarios, y así direccionar su migración.

Las integrinas son glicoproteínas transmembranales de aproximadamente 1500 aminoácidos que forman estructuras heterodimerica con subunidades α y β, cada una formando un dominio extracelular que median la interacción entre célula y célula. La integrina α4β7 media la migración de linfocitos provenientes de circulación a través de las VEA para acceder a la LP intestinal. El ligando de esta integrina es MAdCAM-1 que está presente en las células endoteliales altas. Como se mencionó anteriormente, la quimiotaxis al intestino se da por la secreción de la quimiocina CCL25 por parte de las células epiteliales intestinales y el reconocimiento de esta por CCR9. Tanto la integrina α4β7 como CCR9 se inducen predominantemente en los linfocitos T activados en PP y GLM, por la presencia de ácido retinóico, al momento de que las CDs presentan antígeno a estas células.[16]. Se ha demostrado que los niveles de ácido retinoíco son mayores en los tejidos linfoides asociados a mucosas que en los periféricos. Asimismo, las altas concentraciones de ácido retinóico en PP y GLM induce la expresión de α4β7 y CCR9 en células B activadas. De esta manera, se ha observado que una gran proporción de células de memoria y efectoras en los órganos linfoides intestinales presentan moléculas de direccionalidad.[17]

2.5 RESPUESTA INMUNE CONTRA ROTAVIRUS

Como se mencionó anteriormente, la infección por rotavirus está limitada exclusivamente a los enterocitos maduros de las puntas de las vellosidades intestinales, por lo que la respuesta inmune intestinal es fundamental para combatir esta infección.

La primera barrera contra la infección por rotavirus es la respuesta inmune innata, principalmente generada por las células epiteliales intestinales. Se ha encontrado que en respuesta a la infección las células epiteliales producen tanto interferones de tipo I como III, los cuales activan genes de respuesta a IFN que coadyuvan a la contención de la infección para que la respuesta inmune adaptativa finalmente la termine en un lapso de 8 a 10 días.[18]

En una infección natural las células B intestinales juegan un papel importante en la contención y eliminación de una infección primaria, a través de la producción de anticuerpos neutralizantes IgA. Estos anticuerpos van dirigidos a las proteínas externas VP4 y VP7 que juegan un papel importante en la infección de las células epiteliales. Cuando existe una reinfección con un rotavirus del mismo serotipo, los anticuerpos generados en la primera infección protegen de manera profiláctica. Sin embrago, cuando la segunda infección es causada por un serotipo diferente, los anticuerpos no previenen la infección, pero esta se da de manera atenuada ya que existen células T de memoria que pueden contener y eliminar la infección.[19]

Por otro lado, las células T-citotóxicas (Tc) participan terminando la infección en las fases tardías de la misma y las células Th auxilian a las respuestas de las células Tc y B a través de la producción de citocinas.[19]

3. ANTECEDENTES

En los últimos años se ha planteado que la proteína intermedia del virión de rotavirus VP6 es un candidato promisorio para el desarrollo de vacunas de nueva generación.[20] Esto se basa en su gran capacidad para inducir respuestas de células T y B, y en el hecho que es la proteína más conservada en todas las cepas de rotavirus A reportadas (87-90%). Esto último abre la posibilidad de diseñar vacunas heterotípicas que puedan proteger contra varias cepas de rotavirus circulantes e inclusive contra las que puedan surgir.

Estudios previos en ratones mostraron que la inoculación intranasal (i.n.) de la proteína recombinante VP6 de rotavirus en conjunto de un adyuvante redujo la excreción viral posterior al reto con rotavirus hasta en un 90%. [21] En esta reducción no participaron los linfocitos B y linfocitos Tc, pero sí los linfocitos Th. [22,23]

Interesantemente, estudios posteriores encontraron que la protección inducida por VP6 podía ser replicada inoculando ratones i.n, con el péptido sintético 289-302 (RLSFQLMRPPNMTP) de VP6 ($VP6_{289-302}$), que es un epítopo reconocido por células T-cooperadoras (Th) en el contexto del MHC clase II IE^d.[24] En presencia de toxina de cólera como adyuvante.[25,26]. Aunque se estableció que la protección inducida era dependiente de células Th e independiente de anticuerpos intestinales IgA, aún no se ha determinado de manera precisa los mecanismos de protección contra la infección en este modelo.

4. Planteamiento del problema

En el modelo murino de vacunación intranasal con el péptido de VP6 289-302 el cual forma la capa más abundante dentro del virión de rotavirus, ha demostrado ser efectivo en la protección contra la infección provocada por este mismo. Este modelo mostró una reducción sustancial de la excreción viral posterior al reto con rotavirus y resultó una herramienta útil para el estudio de estrategias de vacunación, memoria inmunológica, protección independiente de anticuerpos e inmunología de mucosas. Sin embargo, el modelo de vacunación hasta ahora contra agentes infecciosos asociados a el intestino depende de mecanismos no asociados a la respuesta inmune asociada a mucosas, quien se encarga de combatir dichas infecciones. Además, aunado a esto la vía intranasal proporciona un medio directo de estímulo a al MALT.

5. JUSTIFICACION

Gran parte del conocimiento sobre la respuesta inmune se ha obtenido estudiando la respuesta inmune periférica, esto es, la respuesta inmune que no involucra a las mucosas. De hecho, es ampliamente reconocido que la respuesta inmune periférica es ineficiente en el control de patógenos que invaden las mucosas. De esta manera, esto ha conducido a que en años recientes el estudio de la respuesta inmune de mucosas sea una prioridad.

En la actualidad se sabe que las mucosas están coordinadas para su protección a través de un sistema inmune común de mucosas llamado MALT. Las bases celulares de esta conexión se fundamentan principalmente por la expresión de receptores de direccionalidad para mucosas, inducidos específicamente en los sitios inductores de la respuesta inmune en cada mucosa. Esta interconexión abre la posibilidad de inducir respuestas inmunes contra patógenos en una mucosa distinta a la mucosa donde se realizó la inmunización, en particular en mucosas en donde se dificulta la aplicación de vacunas como es el caso de la mucosa gastrointestinal.

Rotavirus es la principal causa de gastroenteritis severa en niños a nivel mundial, La inducción de diarrea severa se debe a que este virus infecta y destruye exclusivamente a los enterocitos de las puntas de las vellosidades del intestino delgado. Esta característica, unido a que solamente la respuesta inmune intestinal participa en la erradicación de la infección, hace de la infección por rotavirus un excelente modelo para estudiar la respuesta inmune intestinal.

La proteína VP6 que confirma la capa intermedia del virión, es la más abundante y conservada entre todas las cepas de rotavirus. Asimismo esta proteína VP6 es altamente inmunogénica e induce una respuesta inmune protectora contra la infección dependiente de células T e independiente de anticuerpos intestinales IgA. Esta protección puede ser replicada con el péptido sintético $VP6_{289-302}$, que es un epítopo reconocido por células T-cooperadoras (Th) en el contexto del MHC clase II IE^d, ya que su inoculación i.n en presencia de toxina de cólera como adyuvante, induce hasta un 90% de protección totalmente dependiente de células Th. De esta, manera, este es un excelente modelo para estudiar los mecanismos por los cuales una estimulación antigénica en el epitelio nasal

induce una protección contra la infección a nivel intestinal dependiente de células Th.

Es sabido que las células T requieren del receptor de direccionalidad α4β7 para poder ingresar a la mucosa intestinal, por lo que es probable que la vacunación i.n induzca células Th péptido específicas con este receptor, que posteriormente viajan a través del torrente sanguíneo para establecerse como células de memoria tanto a nivel sistémico como en órganos linfoides de la mucosa intestinal. De esta manera, en este trabajo se propone determinar si la migración de las células Th péptido específicas estimuladas en el epitelio nasal dependen del receptor de direccionalidad α4β7 para ingresar a los órganos linfoides de la mucosa intestinal y de esta manera ejercer su función efectora contra la infección.

6.OBJETIVOS

6.1 Objetivo general:

Evaluar el impacto de la integrina α4β7 presente en las células Th en la protección contra la infección por rotavirus en un modelo murino de vacunación intranasal con el péptido sintético $VP6_{289-302}$.

6.2 Objetivos particulares:

1.- Determinar la proporción de células Th péptido específicas de memoria positivas para la integrina α4β7 en bazo, ganglio linfático mesentérico y lámina propria intestinal en ratones inmunizados i.n con el péptido sintético $VP6_{289-302}$.

2.- Determinar sí la protección contra la infección por rotavirus, inducida en los ratones inmunizados i.n con el péptido sintético $VP6_{289-302,}$ puede ser abolida por la administración de un anticuerpo monoclonal específico para la integrina α4β7.

7.HIPÓTESIS

1. Como resultado de la vacunación i.n con el péptido sintético $VP6_{289-302}$ en presencia de toxina de cólera, se aumentará la proporción de las células de memoria Th $\alpha4\beta7^{+}$ tanto en bazo como en los órganos linfoides intestinales siendo mayor en estos últimos.
2. Asimismo, la administración de un anticuerpo monoclonal bloqueador específico para α4β7, justo antes del reto con rotavirus, eliminará la protección por las células Th.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Ratones

Las inmunizaciones se realizaron en ratones hembra BALB/c (H-2^d) de 5 a 6 semanas de nacidos libres de patógenos del Bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM. Los ratones se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Medicina, UAEM. Para la producción de líquido ascítico se usaron ratones desnudos obtenidos y mantenidos en el Bioterio de la facultad de Medicina, UAEM.

8.2 Medios de Cultivo

Todos los medios y reactivos empleados en cultivo celular fueron adquiridos fueron adquiridos de GIBCO BRL, a menos que se indique otra cosa.

8.3 Diseño experimental

Grupos de ratones fueron inoculados intranasalmente (i.n) con 50 µg del péptido sintético $VP6_{289-302}$ (RLSFQLVRPPNMTP).[24] en presencia de 2.5 µg de Toxina colera (TC) (Sigma) como adyuvante, o con TC solamente. Después de 21 días los ratones se reinocularon de la misma manera. Veintiún días después de la segunda inoculación, los ratones fueron retados oralmente con el RV murino EDIM y la carga viral en las heces se evaluó por un ensayo de ELISA. En algunos casos los ratones vacunados fueron tratados con un anticuerpo monoclonal antes y después del reto con el virus. En otros casos, en vez del reto con el virus los ratones fueron sacrificados y las células Th del bazo, GLM y PP analizadas por citometría de flujo para determinar la frecuencia de expresión de $\alpha 4\beta 7$ en la superficie celular

8.4 Obtención de células

El bazo, el timo, GLMs y PPs fueron extraídos de los ratones y se mantuvieron en 10 ml de RPMI 1640 (GIBCO) a 4°C. Posteriormente, se transfirieron a una caja de Petri en donde fueron macerados y la suspensión celular transferida a un tubo de 15 ml. Las células se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a 4°C y en

el caso de las células de GLM y PP se lavaron dos veces con PBS bajo las mismas condiciones, se resuspendieron con RPM1 y se contaron en un hemocitómetro. En el caso de las células de bazo, estas se incubaron con cloruro de amonio 0.15 M a temperatura ambiente por 2 min para eliminar los eritrocitos, se lavaron dos veces RPMI, se resuspendieron en el mismo medio y se contaron. En todos los casos las células se analizaron por citometría de flujo

8.5 Análisis de las células por citometría de flujo

Un millón de células de los diferentes órganos linfoides obtenidos se lavaron dos veces con buffer de enlace (BE;0.01% de azida de sodio, 2mM de EDTA, y 2% de suro fetal bovino) más 2% de suero de conejo (para bloquear receptores Fc), se resuspendieron en el mismo buffer y se incubaron por 30 min a 4°C. Las células se lavaron con BE y se resuspendieron en 100 µL de BE conteniendo los anticuerpos monoclonales anti-CD4-PE (Clona RH4-5; Bioscience), anti-CD8-PE (Clona 53-6.7) ó anti-$\alpha 4\beta 7$-PE (Clona DAKT-32; Bioscience) 1:200 y se incubaron por 20 min a 4°C. Después de lavar 2 veces las células se fijaron con 100 µL de paraformaldehído 2% a TA por 20 min. Alternativamente, las células se incubaron con los Acms anti-CD4-PE 1:200 y 2 µg de DAKT-32 anti-$\alpha 4\beta 7$ purificado, seguido de un Acm de ratón anti-IgG1/2b de rata (Clona G28.5; BD Pharmingen). Finalmente, 10,000 células fueron adquiridas analizadas por citometría con el citómetro FACS Aria-II (Beckton Dickinson). El análisis (gating) se realizó con el software Flow Jo (Tree Star, Inc).

8.6 Infección de ratones con el RV murino EDIM

Los ratones vacunados fueron previamente 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 (GIBCO) sin suero con $1x10^4$ unidades formadoras de focos (uff) del rotavirus murino silvestre EDIM ($100DI_{50}$). Estudios previos hechos por Ward, McNeal y Sheridan (1990) 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, a partir del día 0 y

hasta el día 8 se colectaron heces y las muestras fueron almacenadas a - 20°C hasta para determinar los niveles de virus excretado, como parámetro de replicación viral.

8.7 Determinación de la carga viral en heces

Las muestras de heces de cada ratón fueron resuspendidas al 5% (peso/volumen) en el siguiente buffer: 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$ (PH 7.4), 5 % suero fetal de bovino (GIBCO), 0.05 % Tween-20, 10 mM azida de sodio. Las muestras re suspendidas en este buffer se almacenaron a 4 °C toda la noche, para permitir su disgregación. Al siguiente día, las muestras fueron agitadas en vórtex y centrifugadas a 14,000 rpm por 5 minutos, se obtuvo el sobrenadante y se determinó la carga viral por un ensayo de ELISA de captura (Esquivel et al., 2000). Microplacas de 96 pozos de fondo redondo (Costar Alta adherencia), fueron cargadas con 50 µL de TNC (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl2) conteniendo un anticuerpo policlonal hiperinmune de cabra contra varias cepas de rotavirus como anticuerpo de captura a una dilución de 1:2500 y se incubó toda la noche a 4 ºC. Al día siguiente se lavaron las placas 2 veces con TNC/Tween 0.05% (solución de lavado) y se bloqueó con 150 µL de TNC/5% de leche en polvo descremada (Carnation)/Tween 0.05% (solución de bloqueo) por 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó 2 veces, se agregaron 50 µL del sobrenadante de la suspensión de heces por duplicado y se incubó por 2 horas a 37 ºC. Se lavó 4 veces, se adicionaron 50 µL de solución de lavado con un anticuerpo policlonal hiperinmune de conejo anti-rotavirus RRV diluido 1:500 y se incubó por 1 hora a 37 ºC. Posteriormente, se lavó 4 veces y se adicionaron 50 µL de una dilución de 1:2000 de un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed) y se incubó por 1 hora a 37 ºC. Se lavó 4 veces y se adicionaron 50 µL del sustrato (p-nitrofenil fosfato disodio; Sigma) diluido 1:100 en DAE (0.1% Dietanolamina, 1 mM MgCl, 0.029% Azida de sodio). La reacción se llevó a cabo de 30 minutos a 1 hora a 37 ºC y la absorbancia a 405 nm se leyó en un lector de placas (Bio-Tek instruments inc.). Como control positivo se utilizó un lisado de células MA-104 infectadas con el rotavirus RRV y como control negativo DMEM.

La protección se medió en base a la siguiente fórmula:

%Protección= [1-(Sumatoria Absorbancia de carga viral en heces de ratones inmunizados con péptido/ Sumatoria Absorbancia de carga viral en heces de ratones control)] X 100.

8.8 Producción del anticuerpo monoclonal

El hibridoma de rata productor del Acm DAKT-32 anti- α4β7 de ratón se cultivó *in vitro* en medio RPMI suplementado con 20% de suero fetal de bovino, $5x10^{-5}$ M de β-2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina y 10 µg/mL de gentamicina en cajas de cultivo de 175 cm^2 (Falcon) e incubadas a 37 °C con 5 % de CO_2. Una vez que las células alcanzaron un 80% de saturación se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a 4°C, se lavaron dos veces con RPMI sin suplementar bajo las mismas condiciones, se resuspendieron en 2 mL de RPMI y se contaron. Se inocularon $5x10^6$ células intraperitonelamente (i.p) en ratones desnudos, inoculados en la semana previa con Pristane (Sigma) i.p., y 15 a 20 días después se obtuvo el ascites. El Acm se purificó a partir del líquido de ascitis por medio de una columna de sefarosa G (GE, Health Care). El Acm se eluyó con Glicina 0.1 M pH 2.7, colectándose fracciones de 1 mL en tubos de vidrio con 50 µL de Tris 1 M pH 9 para neutralizar la solución y la se midió la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (UNICO). Las fracciones positivas se mezclaron y se concentraron por medio de una membrana AMICON con poro de 50 kDa (Merck) por centrifugación. El anticuerpo se disolvió en PBS y la concentración final de este se determinó por medio de un ensayo de ácido bicinchonínico (BCA) (Thermo Scientific). Se almacenaron alícuotas de 1 mL a -20 °C hasta su uso.

8.9 Electroforesis PAGE-SDS

Para el análisis del Acm purificado se realizó una electroforesis PAGE-SDS. Para esto se preparó un gel de acrilamida al 10% mezclando 1.9 ml de agua destilada, 1.7 ml de acrilamida 30% (Biorad), 1.3 ml Tris 1.5 M pH 8.8, 0.05 ml SDS 10%, 0.05 ml persulfato de amonio (APS) 10% y 0.002 ml de TEMED para un volumen total de 5 ml. La solución se vertió entre los cristales, evitando que se formaran burbujas, inmediatamente se agregó agua destilada para nivelar la superficie del gel. Una vez polimerizado el gel, se agregó un segundo gel a una concentración de 5% de acrilamida y se polimerizó en presencia de un peine de plástico con

muescas. Posteriormente, las placas de vidrio fueron insertadas en la cámara de corrida y se agregó un volumen apropiado de buffer de corrida (25 mM Tris-base, 250 mM Glicina, 0.1% SDS)- Las muestras de Acm se mezclaron con buffer de carga (35 mM de Tris pH 6.8, 2% SDS, 5% v/v glicero,l1% de 2-β mercaptoetanol y 0.1% de azul de bromofenol) en un volumen final de 20 µl, se hirvieron por 4 minutos, se enfriaron en hielo y se cargaron en las diferentes muescas del gel. Como control de corrida se utilizaron 4 µl de una mezcla de marcador de peso molecular con un rango de 250-10 KDa (Fermentas). Las proteínas se corrieron aplicando una corriente inicial de 5 mAmp por 5 minutos y posteriormente de 20 mAmp por 60-80 minutos. Al término de la corrida el gel fue extraído y colocado en una solución fijadora (50% metanol, 10% ácido acético) por 20 minutos. Finalmente, el gel fue teñido con una solución de azul de Coomassie (50 % metanol, 0.05% p/v azul de Coomassie R-250 y 10 % de ácido acético) por 1 hr. El exceso de tinción fue eliminado por agitación en una solución de 10 % de ácido acético.

8.9 Inoculación de ratones con anticuerpos monoclonales y el fármaco FTY720

Ratones vacunados fueron inoculados i.p. con 150-250 µg del Acm DAKT-32 anti-α4β7 de ratón purificado en PBS a los días ´-3, 0 y +3 con respecto al reto con rotavirus. Como control de isotipo, otro grupo de ratones se inoculó por la misma vía con el anticuerpo de rata (Ig2a) 2A3 purificado específico para trinitrofenol (InVivo Plus). El fármaco FTY720 (Fingolimod) (Sigma), el cual es un análogo de la esfingosina que actúa reteniendo los linfocitos en el interior de los ganglios linfáticos, disminuyendo la presencia de linfocitos reactivos en circulación, este junto con PBS fue inoculado i.p. en ratones vacunados con el péptido VP6 289-302 a una concentración de 1 mg por kg de peso del ratón en los días -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5 respecto al reto con el rotavirus EDIM.

8.10 Interpretación de los resultados

El análisis de los datos obtenidos del experimento para Determinar la carga viral en las heces de ratones; se utilizaron distintas herramientas como pruebas estadísticas: Comparación múltiple de grupos experimentales contra los grupos controles, una prueba de ANOVA.

9. RESULTADOS

9. 1 Producción y purificación del anticuerpo monoclonal DATK32 anti-α4β7

El hibridoma DATK32 de rata que produce el anticuerpo monoclonal anti- α4β7 de ratón, fue cultivado *in vitro* en medio completo. Para la producción de ascites, ratones desnudos tratados previamente i.p. con Pristane fueron inoculados por la misma vía con 2-6 x10^6 células del hibridoma. Entre 15 y 25 días después se obtuvo el ascites de los ratones rico en el anticuerpo monoclonal anti- α4β7. Se realizaron un total de 8 procedimientos independientes y en cada uno el Acm presente en los ascites fue purificado por medio de una columna de proteína G. La presencia del Acm purificado se midió a una absorbancia de 280 nm y las fracciones que presentaban los mejores niveles de absorbancia fueron mezcladas. En la Figura 3 se muestra una purificación representativa.

Posteriormente, la mezcla de fracciones del Acm se concentro por centrifugación en un filtro Amicon Millipore con un corte de 50 kDa, y se cuantificó la proteína por el método de BCA. En la Tablas 1 se resumen los datos de las diferentes purificaciones realizadas con la cantidad de anticuerpo obtenidos en estas, La pureza del anticuerpo purificado se verificó en un gen de acrilamida teñido con azul de Coomassie en condiciones reducidas (Figura 4), donde se pueden apreciar las bandas de 50 y 25 kDa correspondientes a la cadena pesada y ligera del anticuerpo, respectivamente. La presencia de bandas contaminantes fue minoritaria.

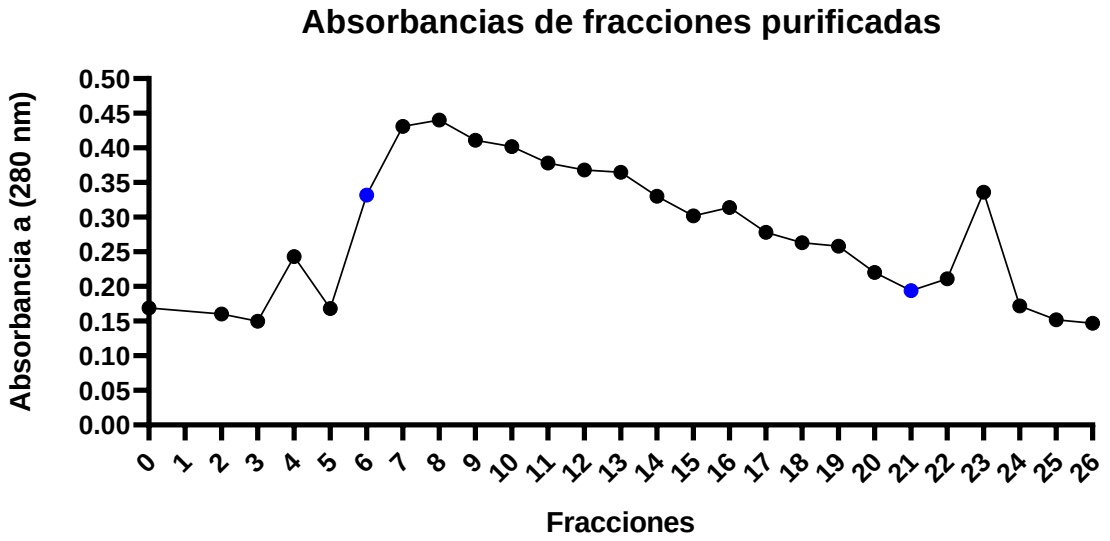


Figura 3. **Absorbancia de las fracciones obtenidas en la purificación del anticuerpo anti α4β7.** Fracciones colectadas 6-18 las cuales mostraron una mayor absorbancia.

TABLA 1 Resumen de las diferentes purificaciones el Acm anti- α4β7 a partir de ascites.

Muestra	Fecha de purificación	Cantidad total obtenida
1	18/08/22	236 µg
2	28/07/22	1.5 mg
3	07/11/22	2 mg
4	01/09/23	1 mg
5	11/08/23	2 mg
6	24/01/23	6 mg
7	17/08/23	2 mg
8	04/09/23	1 mg

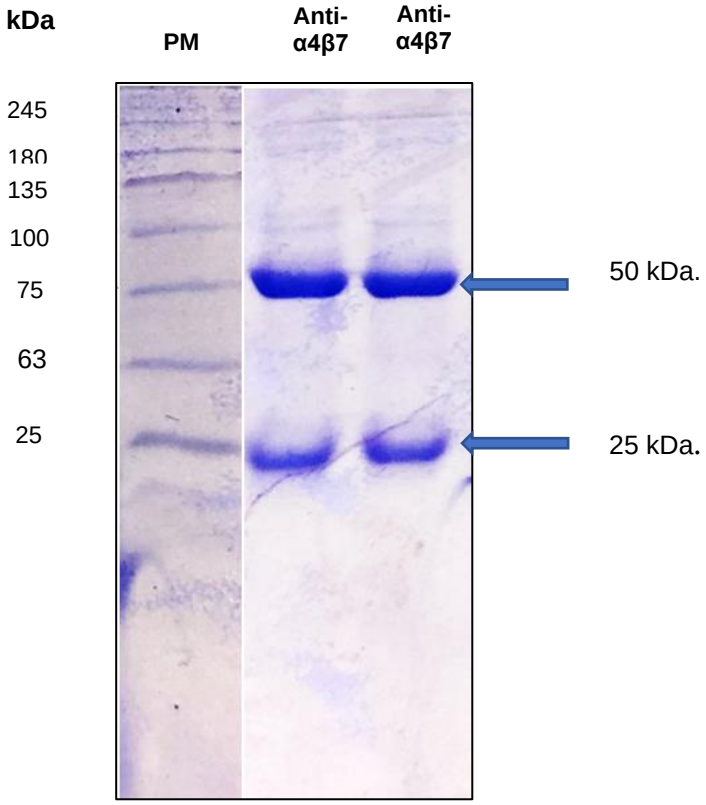


Figura 4. **Determinación de la integridad de anticuerpo HB 294 anti-α4β7**. Análisis por SDS-PAGE al 10% del anticuerpo en condiciones reductoras y no reductoras. El gel se fijo y teñido con azul de Comassie. Se visualiza en el gel la banda de 75 kDa que corresponde a la cadena pesada del anticuerpo y la banda de 25 kDa pertenecientes a la cadena ligera. Para ambos carriles (1 y 2) se cargo muestras de dos lotes del anticuerpo anti-α4β7.

9. 2 Determinación de células Th de memoria que expresen α4β7 inducidas tras dos inmunizaciones intranasales con el péptido sintético de VP6 $_{289-302}$, provenientes de Bazo, GLM y Placas de Peyer.

Uno de los objetivos del proyecto era determinar la frecuencia de células Th de memoria que expresaran el receptor α4β7 en órganos linfoides periféricos y asociados a la mucosa intestinal en ratones vacunados i.n con el péptido. En el laboratorio contábamos con anticuerpo monoclonal comercial contra α4β7 acoplado PE por lo que decidimos comparar la intensidad del reconocimiento de α4β7 del anticuerpo monoclonal comercial y el anticuerpo monoclonal que nosotros produjimos y purificamos. Usamos timocitos para esta tinción, ya que es sabido que estas células expresan α4β7. Las células se tiñeron directamente con el anticuerpo monoclonal comercial o con el anticuerpo purificado, este

último seguido de un anticuerpo de conejo anti-rata acoplado a FITC, y se analizaron por citometría de flujo. Como controles de fluorocromo, las células se tiñeron con un anticuerpo monoclonal anti-CD4-PE o anti-CD8-FITC. Se encontró que 27.9% de los timocitos presentaron señal positiva cuando se tiñeron con el anticuerpo comercial anti- α4β7-PE y 39.4% cuando se tiñeron con el anticuerpo purificado en el laboratorio (Figura 5). De esta manera, este resultado nos indicó que efectivamente el anticuerpo monoclonal anti- α4β7 purificado en el laboratorio reconocía este heterodímero de integrinas y que este reconocimiento era al menos tan eficiente con el encontrado con el anticuerpo monoclonal comercial.

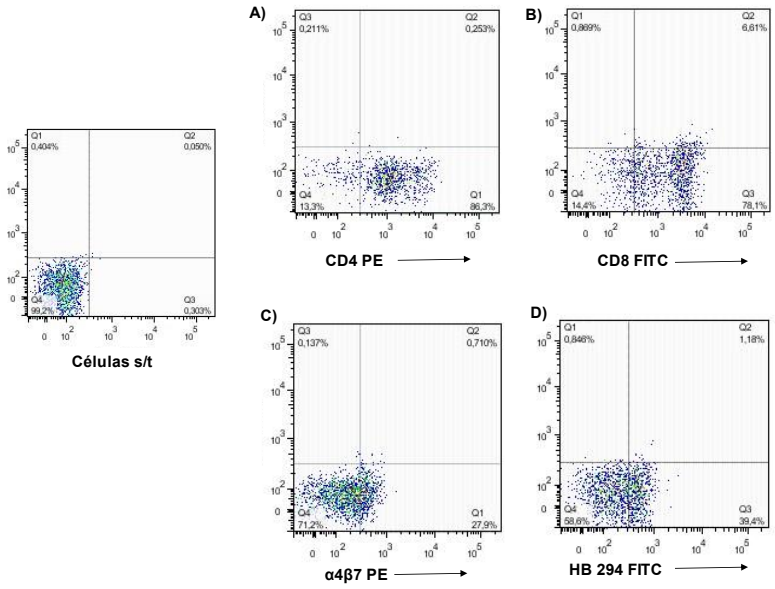


Figura 5. Datos de citometría de flujo que indican α4β7 comercial / α4β7 Ab monoclonal purificado de ratón. A) Células marcadas con CD4 PE, **B)** Células marcadas con CD8 FITC, **C)** Células marcadas con Anti-α4β7 PE, **D)** Células marcadas con Anti- α4β7 (HB 294) con FITC como marcadores para población de células Th.

Una vez que se validó la especificidad del Acm anti-α4β7 producido en el Laboratorio, se procedió a determinar si la vacunación intranasal con el péptido inducia un aumento de células T $CD4^+$ $\alpha4\beta7^+$ en órganos linfoides periféricos y asociados a la mucosa intestinal. Así, grupos de ratones fueron inoculados i.n. con el péptido $VP6_{289-302}$ en presencia de TC o con la TC sola y 21 días después los ratones se reinocularon bajo las mismas condiciones. A los días 5 y 15 posteriores a la primera y segunda inoculación, las células de bazo, GLM y PP de un ratón fueron analizados por citometría de flujo usando un Acm anti-CD4-

PE y el Acm anti-α4β7 producido en el laboratorio. Este último se reveló con un Acm comercial específico para IgG1/2a de rata acoplado a FITC. En cada análisis determinó el porcentaje de células CD4+ α4β7+. Se encontró que tanto las células de GLM como de PP de ratones vacunados con el péptido mostraron un claro aumento en el porcentaje de células CD4+ α4β7+ , con respecto al control, a partir del día 15 posterior a la primera inoculación y el día 5 posterior a la segunda inoculación, disminuyendo para el día 15 posterior a la segunda inoculación (Figura 6). Las células de bazo presentaron un ligero aumento de la población CD4+ α4β7+ en ratones vacunados con el péptido, con respecto al control, solamente a los días 5 y 15 posteriores a la primera inoculación. Estos resultados indican que las células T CD4+ α4β7+ inducidas por la vacunación i.n. con el péptido se distribuyen en órganos linfoides tanto periféricos (bazo) como asociados a intestino (GLM y PP), siendo predominante en estos últimos.

En los resultados de células 5 dias post 2da inmunizacion se observo un aumento de fluorescencia en la poblacion de celulas provenientes de GLM y diseminandose en P.P de ratones inmunizados con VP6 $_{289\text{-}302}$ en comparación de las células de ratones sin estimulo con el péptido, lo que sugiere que estas celulas de memoria CD4/ α4β7 + podrian estar migrando hacia los organos linfocides asociados al intestino como p.p, lo que no se puede mostrar con claridad en los dias post 1ra inmunizacion.

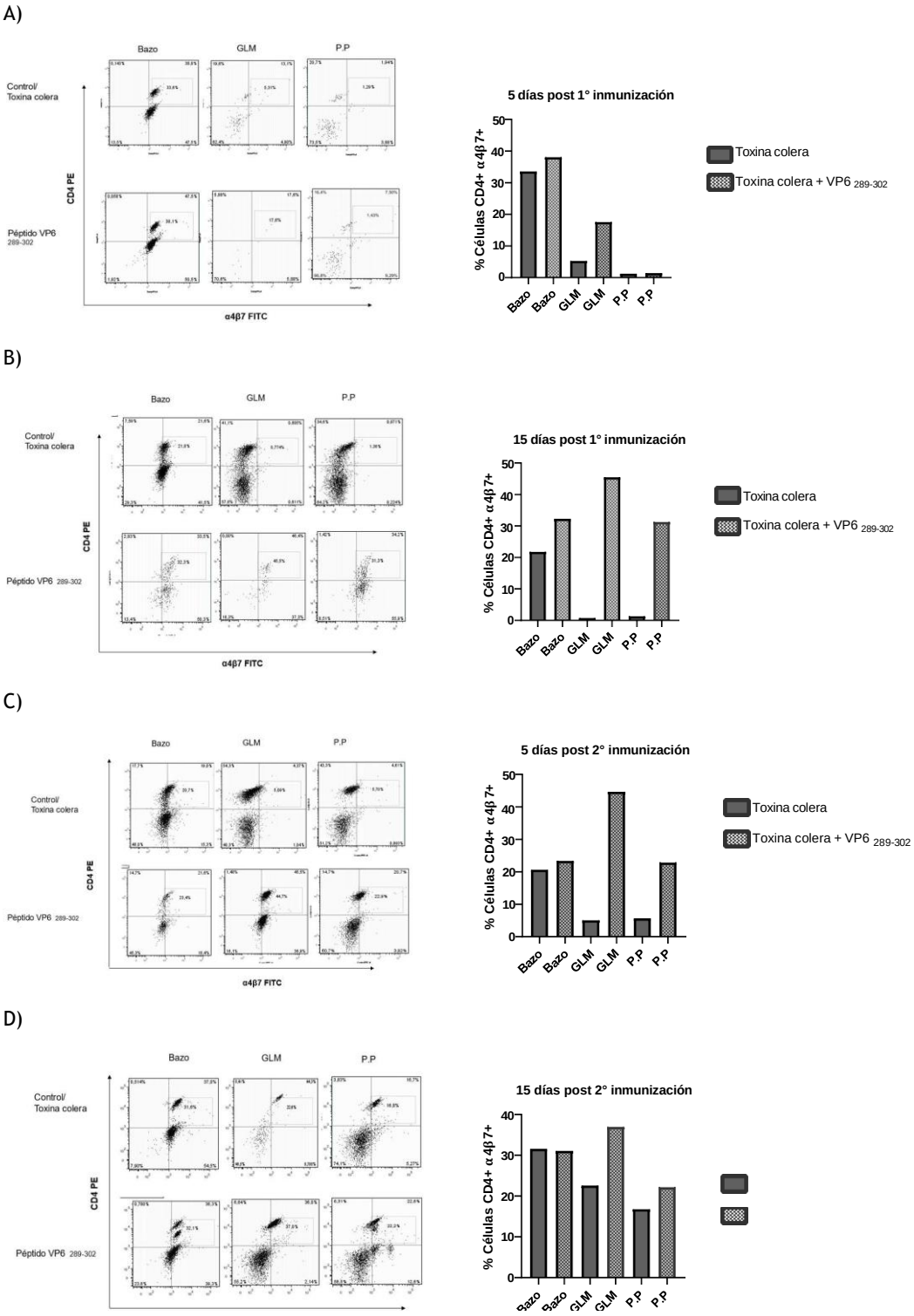


Figura 6. Efecto de la inmunización con VP6 $_{289-302}$ en células de ratones marcadas con el Acm anti-α4β7 extraídas después de las inmunizaciones. (A) Análisis de población CD4/α4β7+ 5 días post 1ra inmunización mediante análisis por citometría de flujo- dot blot que muestran la comparación entre células de bazo, glm y Placas de Peyer. B) Análisis de población CD4/α4β7+ 15 días post 1ra inmunización mediante análisis por citometría de flujo- dot blot que muestran la comparación entre células de bazo, glm y Placas de Peyer. C) Análisis de población CD4/α4β7+ 5 días post 2da inmunización mediante análisis por citometría de flujo- dot blot que muestran la comparación entre células de bazo, glm y Placas de Peyer. D) Análisis de población CD4/α4β7+ 15 días post 1ra inmunización mediante análisis por citometría de flujo- dot blot que muestran la comparación entre células de bazo, glm y Placas de Peyer

9. 3 Papel del receptor de direccionalidad α4β7 en la protección inducida contra la infección por la vacunación i.n con el péptido VP6$_{289-302}$

Para evaluar el papel que juega el receptor de direccionalidad a intestino α4β7en la protección contra la infección por RV inducida por la vacunación i.n con el péptido VP6 $_{282-302}$, cinco ratones fueron inoculados i.n con 50 µg del péptido sintético y 2.5 µg de TC como adyuvante. A los días -3, 0 y 3 con respecto a la infección (reto) con el rotavirus murino EDIM se inocularon 3 ratones i.p. con 150 µg del anticuerpo monoclonal DAKT 32 anti-α4β7 y dos ratones con 150 µg del anticuerpo control de isotipo de rata (IgG2a) 2A3 específico para nitrofenol. Como control, un grupo de 5 ratones fueron inoculados i.n solamente con TC, los cuales se trataron con anticuerpos como se indica arriba.

Se encontró que en el grupo control inoculado con i.n con TC y tratado con el anticuerpo control de isotipo presentó una curva de replicación viral clásica, la cual fue casi idéntica al grupo tratado con el anticuerpo anti-α4β7 (Figura 7A). En el caso del grupo vacunado i.n con el péptido VP6$_{289-302}$ más TC y tratado con el anticuerpo control de isotipo, como se esperaba, se encontró una reducción de la carga viral de un 95% con respecto a los ratones control. Cuando los ratones fueron tratados con el anticuerpo anti-α4β7 (Figura 7A), se observó un ligero aumento en la carga viral a los días 4 y 6, pero estos no fueron significativos. Lo cual significaría que la inoculación del anti-a4b7 parece no afectar la inmunización i.n. con el péptido antigénico.

Una posibilidad que explicaría el hecho que el Acm anti- α4β7 no tuviera un efecto claro sobre la replicación del virus en ratones vacunados con el péptido, era que la dosis aplicada del Acm fuera baja. Así, este experimento se repitió con algunas variaciones. (Figura 11B y C) Seis ratones fueron inoculados i.n con el péptido sintético VP6$_{282-302}$ en presencia de TC y en los días -3, 0 y 3 con respecto a la infección se inocularon 3 ratones con 250 µg del anticuerpo anti-α4β7 y dos ratones con PBS. Como control, 6 ratones se inocularon i.n solamente con TC y se trataron de la misma forma que el grupo experimental con anticuerpo y PBS como se indica arriba. Se encontró que en el grupo control de ratones i.n con TC y tratados con PBS presentó una curva de replicación viral clásica, la cual fue casi idéntica al grupo tratado con el anticuerpo anti-α4β7

(Figura 7B). En el caso del grupo vacunado i.n con el péptido VP6 $_{289-302}$ más TC y tratado con PBS, se encontró una reducción de la carga viral de un 97% con respecto a los ratones control. Cuando los ratones fueron tratados con el anticuerpo anti-α4β7, se observó un aumento en la carga viral a los días 4 y 6, pero estos no fueron significativos (Figura 7B).

Para corroborar este último ensayo, se realizó un tercer experimento donde 5 ratones fueron inoculados i.n con el péptido sintético VP6 $_{282-302}$ TC, 3 ratones fueron tratados i.p. con 250 µg del Acm anti-α4β7 y dos con PBS a los tiempos indicados arriba. Como control, 3 ratones fueron inoculados i.n con TC e inoculados i.p. solamente con PBS. Como se esperaba, los ratones control tuvieron una curva de replicación clásica. En el caso de los grupos inmunizados i.n con el péptido VP6$_{289-302}$ más TC y tratados con PBS se encontró que los ratones tuvieron una protección contra la infección de un 73% con respecto a los ratones control. En el grupo i.n con VP6 $_{289-302}$ pero tratados i.p con el anticuerpo anti-α4β7, se observó un aumento en la carga viral a los días 4 y 6, pero este no fue significativo (Figura 7C).

Estos resultados sugieren que en los tiempos que se inoculó el Acm anti- α4β7, este no tiene un efecto significativo sobre el aumento de la carga viral, posiblemente porque las células T inducidas en el NALT con el marcador de direccionalidad α4β7 habían migrado previamente a la mucosa intestinal, donde participaron en la protección contra la infección.

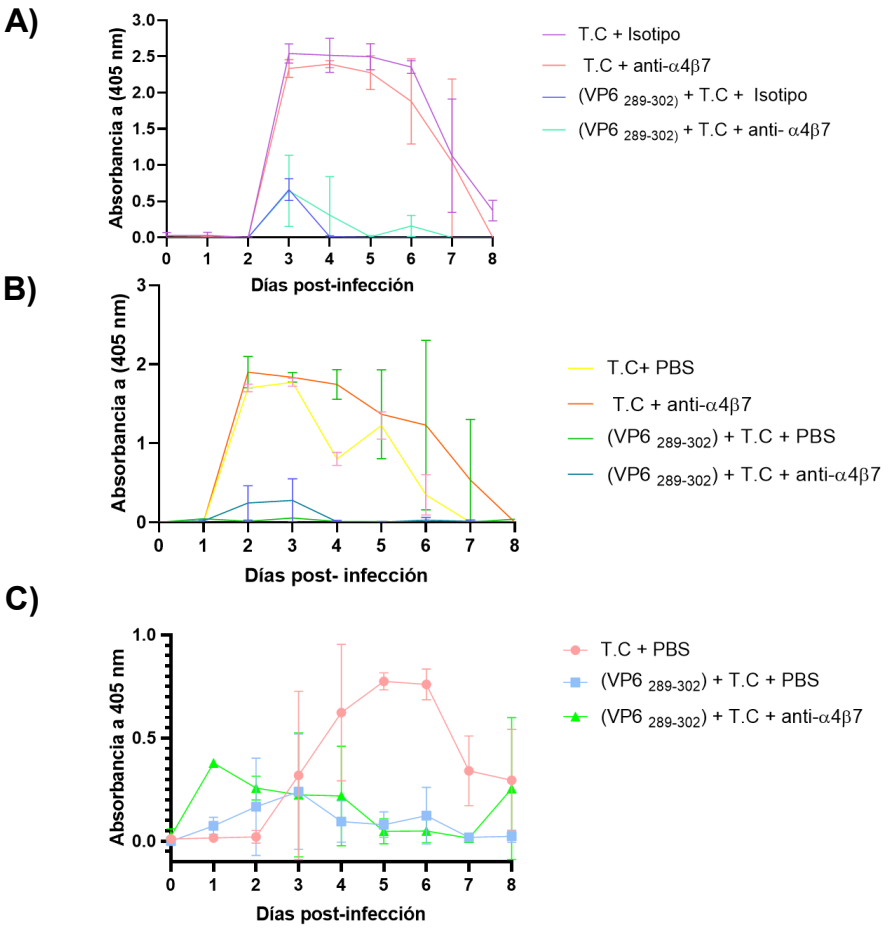


Figura 7. Efecto de la administración del Acm anti- α4β7 en ratones inmunizados con el péptido sintético de VP6 289-302 + Toxina de colera como adyuvante.
A) Los ratones recibieron dos inmunizaciones con VP6 289-302 + T.C en el día 0 y 21 días, el reto con el virus EDIM e i.p con el Ab HB 294 anti- α4β7 (150 µg dosis) e isotipo (150 µg por dosis) a los días -3, 0 y +3 post reto. **B)** Los ratones recibieron dos inmunizaciones con VP6 289-302 + T.C en el día 0 y 21 días, el reto con el virus EDIM e i.p con el Ab HB 294 anti- α4β7 (250 µg dosis) y PBS (500 µl dosis) para los ratones control. **C)** Los ratones recibieron dos inmunizaciones con VP6 289-302 + T.C en el día 0 y 21 días, el reto con el virus EDIM e i.p con el Ab HB 294 anti- α4β7 (250 µg dosis) y PBS (500 µl dosis) para los ratones control. La carga viral fue evaluada en las heces desde el día 0 al día 8, midiéndolo mediante un ensayo de ELISA.

Efecto del fármaco FTY720 en la protección inducida contra la infección por la vacunación i.n con el péptido VP6$_{289-302}$

Con base a los resultados anteriores, es posible que las células Th α4β7 generadas en NALT, presentes en un órgano linfoide asociado a mucosa intestinal como el GLM, no contribuyen significativamente a la protección en el momento de la administración del Acm y el reto con el virus. Para corroborar esta idea, se utilizó el fármaco FTY720 el cual es un antagonista del receptor de esfingosina- 1 fosfato, por lo que es un modulador de la salida de los linfocitos de los órganos linfoides secundarios.[27]

De esta manera, si el GLM contribuye a la migración a la mucosa intestinal de los linfocitos Th péptido-específicos para la protección a nivel intestinal, la administración de FTY720 abrogaría la protección inducida. De esta manera, se inocularon 6 ratones i.n con el péptido sintético de VP6 $_{282\text{-}302}$ en presencia de TC y en los días -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5 con respecto a la infección con rotavirus se inocularon 3 ratones con 20 µg de FTY720 y tres ratones con PBS solo. Como control un grupo de 3 ratones fueron inoculados solamente con TC (Figura 8). Se encontró que los ratones inoculados con el péptido sintético presentaron un 81% de reducción de la carga viral en heces en comparación con el ratón control. Cuando los ratones vacunados con el péptido y tratados con FTY720 se observó un ligero incremento de la carga viral a los días 1, 2 y 6 con respecto a la carga viral de los ratones vacunados con el péptido sin tratamiento, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas, esto según las Pruebas estadísticas realizadas, entre ellos ANOVA (datos no mostrados en el escrito).

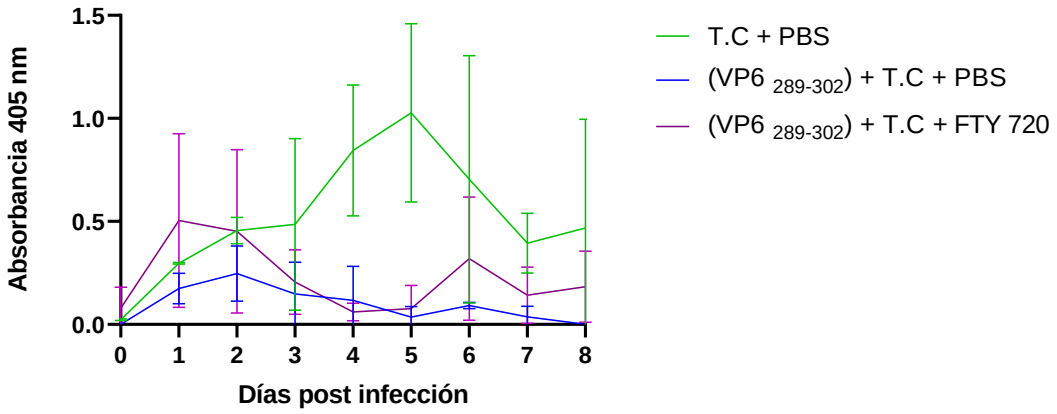


Figura 8. Efecto de la administración del fármaco FTY720 en ratones inmunizados con el péptido sintético de VP6 289-302 + Toxina de colera como adyuvante. Los ratones fueron i.n con Toxina del colera más péptido sintético de VP6 289-302 con dos dosis, la primera el día 0 y recibieron la segunda i.n 21 días después, fueron retados con virus murino EDIM de rotavirus e i.p con respecto al reto días -1,0, + 1, 2, 3, 4, 5, con FTY720 y PBS (500 µl por dosis) para los ratones control. Y como grupo control a ratones i.n con Toxina del colera y fueron tratados de la misma forma que los ratones inmunizados con el péptido VP6 289-302. La carga viral fue evaluada en las heces desde el día 0 al día 8, midiéndolo mediante un ensayo de ELISA.

10. DISCUSIÓN

La proteína VP6 de RV es una proteína estructural que constituye la capa intermedia del virión y se encuentra altamente conservada en su secuencia de aminoácidos en todas las cepas de RV A reportadas. Se ha demostrado que cuando se inocula parenteralmente como a nivel de la mucosa nasal induce protección contra la infección por RV a nivel intestinal y la protección depende principalmente de células T. De esta manera, VP6 se considera como un candidato importante para la generación de una vacuna heterotípica contra RV en el futuro.

En un trabajo previo del laboratorio.[24] Se demostró que la secuencia de aa 289-302 de VP6 representa un epítopo de células Th reconocido en el contexto por la molécula MHC clase II de ratón IE^d. Posteriormente, se estableció que el péptido $VP6_{289-302}$ inoculado i.n en presencia de Toxina de Cólera podía inducir una potente respuesta protectora contra la infección por RV, esta respuesta es inclusive más potente que la observada con la proteína completa.[25.26] Dado que la protección depende totalmente de células Th péptido específicas, este modelo de vacunación ofrece una excelente oportunidad para estudiar la conexión entre la respuesta inmune inducida en NALT y la protección ejercida por las células efectoras en intestino, ya que solamente se tiene que enfocar a las células Th péptido específicas.

El objetivo principal de este trabajo fue analizar el papel de receptor de direccionalidad α4β7, presente en las células Th, en la protección inducida por el péptido $VP6_{289-302}$ contra la infección por RV cuando se administra i.n en presencia de un potente adyuvante de mucosas como es la TC.

Para analizar el papel del receptor de direccionalidad α4β7 presente en las células Th inducidas en NATLT, se usó el anticuerpo monoclonal de rata DAKT32 específico para este receptor en ratón. Este anticuerpo reconoce un epítopo compartido por el heterodímero de las integrinas.[28] Y se ha demostrado que inhibe el enlace de estas integrinas con MAdCAm-1 *in vitro* e *in vivo.* El Abm se produjo en ascites *in vivo* y se purificó en una columna de sefarosa G. La pureza e identidad se determinó por un gel de acrilamida y la especificidad por medio de

un ensayo de citometría de flujo usando timocitos de ratón, ya que se ha reportado que esta población expresa niveles significativos de las integrinas α4β7.[29]

Una vez obtenido el Acm puro y funcional se procedió a determinar la cinética de la aparición de células Th positivas para α4β7 a nivel sistémico (bazo) y de mucosa intestinal (PP y GLM), en ratones vacunados i.n una o dos veces con el péptido sintético $VP6_{289-302}$ en presencia de TC, o vacunados solamente con el adyuvante. Para esto, las células se analizaron por citometría de flujo usando el Acm anti- α4β7 purificado previamente. En trabajos realizados previamente se ha determinado que tras una inoculación con el péptido sintético de VAP6 289-302, tiene la capacidad de inducir un valor aproximado de 50% en la protección contra la infección contra RV en comparación con los ratones inoculados dos veces con el mismo péptido sintético, que puede alcanzar hasta un 95% de protección (datos no mostrados), lo cual indica que utilizar dos inoculación en los ratones, son necesarias para estimular el crecimiento y producción de las células que además de controlar la infección y eliminarla, también se establecen como células de memoria Th péptido específicas.

Se encontró que en el bazo las células Th α4β7+ tenían un ligero aumento con respecto al control solamente después de la primera inoculación. En contraste, estas células aumentaban significativamente en PP y GLM al día 15 post-primera inoculación y 5 post-segunda inoculación, declinado para el día 15 post-segunda inoculación. Es claro que las células Th α4β7 estimuladas en NALT viajan a nivel sistémico (bazo) y a órganos linfoides asociados a la mucosa intestinal (PP y GLM), sin embargo, hay una predominancia en esta diseminación hacia estos últimos. Esto apoya la idea que las células Th α4β7 estimuladas en NALT ingresan a la lámina propria intestinal donde ejercen su función efectora.
Este resultado corrobora los resultados con el Acm anti- α4β7 en el sentido que las células Th péptido-específicas, al momento del reto con el virus, ya están presentes en la lámina propria intestinal o en el compartimiento intraepitelial, y que la migración de las células del GLM o de la periferia tiene un impacto mínimo en la protección contra la infección.

Es importante mencionar que una limitación de estos experimentos es que se determinó el porcentaje de las células Th α4β7, con base a que muy probablemente esta es la única población celular estimulada por la inoculación i.n. con el péptido. Sin embargo, para demostrar que son células péptido específicas sería necesario realizar un ensayo de ELSPOT con células Th purificadas y estimuladas *in vitro* con el péptido, o realizar una citometría de flujo usando tetrámeros de la molécula del MHC clase II IE^d cargados con el péptido.

Para tratar de correlacionar el aumento de la frecuencia de las células Th α4β7+, sobre todo en PP y GLM, después de la vacunación i.n con el péptido $VP6_{289-302}$, con la protección inducida a nivel intestinal, ratones vacunados dos veces fueron retados con el RV murino y la carga viral en las heces evaluada por 8 días post-infección. Se encontró que si los ratones se inoculaban i.p con el Abm purificado anti- α4β7 previo al reto con RV, la protección contra la infección era muy similar a la encontrada con ratones vacunados y retados pero inoculados con PBS o con un anticuerpo control de isotipo. Solamente se observó un ligero aumento no significativo de la carga viral en los ratones tratados con el anticuerpo. Este resultado, en principio, nos indicaría que las células Th péptido específicas no requieren del receptor de direccionalidad α4β7 para entrar a la lámina propia intestinal donde se lleva a cabo la función efectora de estas células. Sin embargo, existen varios escenarios que podrían explicar este resultado, uno de ellos es un trabajo previo por Dai, *et al*. (2021) en donde se demostró que las células T pueden ingresar a la lámina propria intestinal de una manera independiente de α4β7 en condiciones de inflamación. Sin embargo, es conocido que la infección por RV genera muy poca inflamación intestinal o reclutamiento de células inflamatorias.[30] Por lo que este mecanismo, en nuestro modelo, parece ser muy poco probable.

Por otro lado, es muy probable que, bajo las condiciones experimentales de este modelo, las células Th péptido específicas α4β7 generadas en NALT viajen a lámina propria y se establezcan en este compartimiento intestinal como células T residentes de memoria (T_{RM}) días después de las inmunizaciones y que para

el momento del reto del virus estas células son las que protegen contra la infección. Como resultado, la administración del anticuerpo anti- α4β7 tendría un efecto muy limitado sobre la infección, como se observó en este trabajo. De hecho, esta idea se apoya con el resultado que la administración de FTY20 antes y durante el reto con rotavirus tampoco tiene un efecto sobre la replicación viral. FTY20 es un análogo de esfingosina 1-fosfato que inhibe la salida de las células T de los ganglios linfáticos.[31]

Para poder demostrar que las células Th α4β7 generadas en NALT son las responsables de la protección, sería necesario montar un modelo de transferencia pasiva de células Th. Para esto, se purificarían células Th α4β7 a partir de GLM de ratones vacunados una o dos veces con el péptido y se transferirían i.v. a ratones naive previo a un reto con RV. Estas células Th deberían de inducir protección a nivel intestinal y su bloqueo con el anticuerpo anti-α4β7 usado aquí debería de inhibir esta protección. Un modelo semejante fue reportado por Ciabattini *et al*. (2011), donde ratones naive fueron transferidos con células T específicas para OVA y retados con este antígeno i.n en presencia de adyuvante. Se encontró que las células T activadas en los ganglios linfáticos drenantes del NALT, ganglios cervicales y ganglios mediastinales, presentaban células T OVA específicas α4β7+ y que posteriormente migraban a bazo y GLM. Interesantemente, la migración al GLM se pudo bloquear con el anticuerpo anti-α4β7. Desafortunadamente, en ese trabajo no se determinó si este anticuerpo también podía bloquear la migración de las células T α4β7+ a lámina propria. Así también como la estandarización de la técnica de i.p con el anticuerpo anti- α4β7 para la inhibición de este mismo.

11. CONCLUSION

En este proyecto de investigación se planteó como objetivo principal analizar el rol de la integrina α4β7 como receptor de direccionalidad presente en células T CD4+ de memoria inducidas por la inmunización intranasal con el péptido sintético de VP6 $_{289\text{-}302}$, un péptido proveniente de la proteína de rotavirus con mayor abundancia dentro del virión, retomando como está la razón de que se eligiera esta secuencia. Se necesitaba realizar la comprobación de que la inmunización intranasal en ratones en dos ocasiones podría generar estas células CD4+ α4β7+ ya que el péptido utilizado es un epítopo de células Th, es por esta razón que el primer objetivo era demostrar que las células pudieran reconocer este receptor como marcador de superficie de células extraídas de bazo, ganglio linfático mesentérico y placas de Peyer; en estos experimentos obtuvimos una buena señal de células CD4+/ α4β7+ provenientes de bazo, seguidas de placas de Peyer en comparación con células de GLM en donde hubo un decremento de estas. El objetivo de comprobar su reconocimiento fue logrado, arrojando estos resultados realizados por citometría de flujo que hay un mayor porcentaje de células CD4+/ α4β7 de memoria después de una segunda inmunización i.n con el péptido de VP6, esto sugiere que debido a una segunda estimulación se incrementan los porcentajes de estas células en órganos linfoides asociados al intestino, así como placas de Peyer que están estrechamente relacionados al intestino que es donde se lleva a cabo la respuesta a la infección por rotavirus.

El siguiente objetivo de este trabajo era conocer si la administración de un anticuerpo que inhibiera la actividad de adhesión de CD4/ α4β7 inducidas i.n con el péptido de VP6 289-302 podía ser eliminada o disminuida, por lo que se realizó ensayos de bloqueo con el ab monoclonal anti- α4β7 vía i.p justo antes del reto con rotavirus murino, 3 días antes y 3 días posteriores y se logró determinar con los resultados de estos que el bloqueo fue muy disminuido, es decir, la protección generada por la i.n con VP6 289-302, se mantuvo casi en su totalidad, esto podría demostrar que en este proyecto realizado ya existen células Th péptido dependiente alojadas en el intestino que estarían generando la protección contra

la infección por rotavirus, que a pesar de inocular el anticuerpo y promover un poco la protección generada por células que llegarían al sitio de infección para combatirla, ya existen células posiblemente (TRM) o células de memoria residentes en los tejidos que combatirían la infección, esto con respeto a el grupo control.

Después del análisis de los resultados obtenidos a lo largo del trabajo se pudo concluir dos cosas, el efecto de la i.n con el péptido sintético de VP6 289-303 un epítopo de células CD4 que induce la expresión del receptor de direccionalidad α4β7 después de la segunda i.n, y por otro lado la evidencia sugerida de células TRM en intestino que no dependen de la circulación nuevamente por el intestino de estas CD4. Aunque se podrían seguir realizando estudios sobre cómo se da la cinética de activación de estas CD4 inducidas por la vacunación con respecto a la infección, el uso de más marcadores de memoria residente para corroborar estos resultados

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stanford Children's Health, 2022
2. Tamayo L, Moreno B. O. *Rotavirus*. (2007). SciElo.
3. Matthijnssens J, Bilcke J, Ciarlet M, Martella V, Bányai K, Rahman M, Zeller M, Beutels P, Van Damme P, Van Ranst M. (2009). Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. Future Microbiol. Dec;4(10):1303-16. doi: 10.2217/fmb.09.96. PMID: 19995190.
4. Sadiq A and Khan J (2024) Rotavirus in developing countries: molecular diversity, epidemiological insights, and strategies for effective vaccination. Front. Microbiol. 14:1297269. doi: 10.3389/fmicb.2023.1297269.
5. Matthijnssens J, Bilcke J, Ciarlet M, Martella V, Bányai K, Rahman M, Zeller M, Beutels P, Van Damme P, Van Ranst M. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. Future Microbiol. 2009 Dec;4(10):1303-16. doi: 10.2217/fmb.09.96. PMID: 19995190.
6. Arias CF, López S. Rotavirus cell entry: not so simple after all. Curr Opin Virol. (2021). Jun;48:42-48. doi: 10.1016/j.coviro.2021.03.011. Epub 2021 Apr 19. PMID: 33887683.
7. Acosta OL., Calderon MN., More LP., Guerrero CA. (2009). *Un modelo del mecanismo de entrada de los rotavirus a la celula hospedera*. Rev. Fac. Med Vol. 57. No. 2.
8. Pan American Health Organization. Family and community Health Area, 2004.
9. Lundgren O, Svensson L. (2001). *Patogenesis of rotavirus diarrhea*. Microbes Infect. 3. 1145-1156. PMID: 11709295.
10. Nagler-Anderson C. (2002). Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. Nat Rev Immunol. Oct;1(1):59-67. doi: 10.1038/35095573. PMID: 11905815.
11. Skansberg A, Sauer M, Tan M, Santosham M, Jennings MC. Product review of the rotavirus vaccines ROTASIIL, ROTAVAC, and Rotavin-M1. Hum Vaccin Immunother. 2021 Apr 3;17(4):1223-1234. doi: 10.1080/21645515.2020.1804245. Epub 2020 Oct 29. PMID: 33121329; PMCID: PMC8018392.

12. Collado VM., Porras R., Cutuli T., Gómez EL. (2002). *The innate immune system i: its mechanisms*. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2 (1) 2008: 1-16.
13. Andrew D.P. (1994). *Los epitopos distintos pero superpuestos estan involucrados en la adhesion mediada por α4β7 a la molecula de adhesion de celulas vasculare*a*-1, la direccion mucosa-1, la fibrotecnina y la agregacion de linfocitos*. J Immunol 153:384-61.
14. Zgair A, Chi J, Wong M, Gershkovich P. (2006). *Targeting Immunomodulatory Agents to the Gut-Associated Lymphoid Tissue*. Chapter 14.
15. Barry KW., Furuta G. (2008). Inmunidad de la mucosa gastrointestinal. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. Vol 121. No 2.
16. Manhas Kavita R. , Marshall Pamela A. , Wagner Carl E. , Jurutka Peter W. , Mancenido Michelle V. , Debray Hannah Z. , Blattman Joseph N. (2022). Rexinoids Modulate Effector T Cell Expression of Mucosal Homing Markers CCR9 and α4β7 Integrin and Direct Their Migration In Vitro. Frontiers in Immunology. Vol 13. DOI=10.3389/fimmu.2022.746484
17. Cornelia B, Ellen L. B, Michael J. B, David P. A, Peter J. K, Bernhard H, Irving L. W, Alf H, and Eugene C. B. (1993). α4β7 Integrin Mediates Lymphocyte Binding to the Mucosal Vascular Addressin MAdCAM. Laboratory of Immunology and Vascular Biology Department of Pathology and the Digestive Disease Center.
18. 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-λ 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.
19. Angel, J., M.A. Franco, and H.B. (2012). Greenberg, *Rotavirus immune responses an correlates of protection*. Curr Opin Virol. 2(4): p. 419-25.
20. Ward RL, McNeal MM. (2010). *VP6: A candidate rotavirus vaccine*. J Infect Dis. 202 Suppl:S101-7.

21. Choi, A.H., *et al.* (2002). *Intranasal or oral immunization of inbred and outbred mice with murine or human rotavirus VP6 proteins protects against viral shedding after challenge with murine rotaviruses*. Vaccine, 20(27-28): p. 3310-21.
22. McNeal MM, VanCott JL, Choi AH, Basu M, Flint JA, Stone SC, Clements JD, Ward RL. (2002). CD4 T cells are the only lymphocytes needed to protect mice against rotavirus shedding after intranasal immunization with a chimeric VP6 protein and the adjuvant LT(R192G). J Virol. Jan;76(2):560-8. doi: 10.1128/jvi.76.2.560-568.2002. PMID: 11752147; PMCID: PMC136815.
23. McNeal MM, Stone SC, Basu M, Bean JA, Clements JD, Hendrickson BA, Choi AH, Ward RL. (2006). Protection against rotavirus shedding after intranasal immunization of mice with a chimeric VP6 protein does not require intestinal IgA. Virology. Mar 15;346(2):338-47. doi: 10.1016/j.virol.2005.11.016. Epub 2006 Jan 10. PMID: 16375942.
24. Baños, D.M., *et al.* (1997). *Identification of a T-helper cell epitope on the rotavirus VP6 protein.* J Virol. 71(1): p. 419-26.
25. Choi AH., *et al.* (2000). *Functional mapping of protective domains and epitopes in the rotavirus VP6 protein*. J Virol. 74(24): p. 11574-80.
26. Choi, A.H., *et al.* (2003). *Functional mapping of protective epitopes within the rotavirus VP6 protein in mice. Belonging to different haplotypes*. Vaccine. 21(7-8): p. 761-7.
27. Jamie F. S. Mann, Paul F. McKay, K, P, John S. T Robin J. S. (2021). El bloqueo de la salida de células T con FTY720 amplía la expresión de la vacuna de ADN, pero reduce la inmunogenicidad. Departamento de Enfermedades infecciosas, Colegio Imperial de Londres, St Mary's Campus, Londres, Rei.
28. Linda A Egger, Kdambi U, Cao J, Van Riper G, McCauley E, Munford RA, Amo S, Lingham R, Lanza T, Lin LS, De Laszlo SE, Young DN, Kopka IE, Tong S, Pokounis B, Benson E, Warwood S, Bargatza RF, Hagmann WK, Schmidt JA, Detmers PA. (2002). Alpha (4) beta (7) /alpha (4) beta (1) dual integrin antagonist block alppha (4) beta (7) - dependent adhesion under shear flow. J Pharmacol. May: 305 (2): 796. PMID: 12065712.
29. David P. Andrew, Lusijah S. Rott, Petter J. Kilshaw, Eugene C. Butcher. (1996). Distribution of α4β7 and αEβ7 integrins on thymocytes, intestinal

epitelial lymphocytes and peripheral lymphocytes. Eur. J. Immunol. 26: 897-905.
30. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, Franco MA, Greenberg HB, O'Ryan M, Kang G, Desselberger U, Estes MK.(2017). Rotavirus infection. Nat Rev Dis Primers. Nov 9;3:17083. doi: 10.1038/nrdp.2017.83. PMID: 29119972; PMCID: PMC5858916.
31. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, Rosen H. (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. Science. Apr 12;296(5566):346-9. doi: 10.1126/science.1070238. Epub 2002 Mar 28. PMID: 11923495.

Cuernavaca, Morelos, 03 de diciembre de 2024.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **PAPEL DE LA INTEGRINA α4β7 EN LA PROTECCION CONTRA LA INFECCION POR ROTAVIRUS EN UN MODELO MURINO DE VACUNACION INTRANASAL CON UN PEPTIDO SINTETICO DE VP6,** que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Mariana Bravo Vizuett. 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.

Atentamente

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:2024-12-05 11:44:04 | FIRMANTE

Jl8nSPrqxe8SM3WZbtium8KDvdIGvsDq/VKPM+zRkXUH3c8IYziNSnwLbXBpRYZuROip4bXpOgVuGAv+E3JmELto15UyReDcfxoOWMZWCG4VmZd7ZZUUpr7XfqifhNUdJmJx
HjPj+ENP2MPbSFKYDeVIzO2GuCuSFEo1qCpdFER9ic3xYRrkusHtWFA/VpPkAU62G307drzpt3NNQVeilWKXMPVC+p1atDvHcKOXxYb81cAb5M5GNGzylHQ0LNDTd3MyuGi2
0rv4I0W9iZae6p16IVZmo+jgHFlus7W1W+5ASEyaItVCDRlQ/eUtqAcjn3zFNMv5WjycaMnBlE4Y6g==

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

Fv4KilLjV

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/52RHwcKp6Zl4mJ5rlqcgTB27Clmebz1j

Cuernavaca, Morelos, 03 de diciembre de 2024.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **PAPEL DE LA INTEGRINA α4β7 EN LA PROTECCION CONTRA LA INFECCION POR ROTAVIRUS EN UN MODELO MURINO DE VACUNACION INTRANASAL CON UN PEPTIDO SINTETICO DE VP6,** que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Mariana Bravo Vizuett. 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.

Atentamente

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:2024-12-03 16:20:29 | FIRMANTE

gVKMGM9uNMAC+9mU60etnr1in17NppFgmj5f2nIoPtohpnNNGX0CcXBAohfUugt4HurRPGWz6owI3HLSgyprY1L62ZJJZi0w8M38cwvAIyPp5no0wPfJXvfmIqpGRLjnx2ECcQ61a0R+nNd54qQn/xEvI9uPqMwRN/7EXfq+eOZcRu45bylrhUXjPDgcSWR4mU/l3nLL0LVIMS12a70Um/HzGywQi6txavc/vDMPXfDL9ZWBeH4onOuvesgALMFf8WT4NX7/fWl57ZvGuEKGrmofWAcDYAWxmueJKiyKYrKVuHEAjYBRDN1x1S0k/ZLv6nRs5l49HBwJVxprfO/3Ow==

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

lK1u4jqtB

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/zjmVT3pUFbeREThSurKZXTmB6lqQHmy

Cuernavaca, Morelos, 03 de diciembre de 2024.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **PAPEL DE LA INTEGRINA α4β7 EN LA PROTECCION CONTRA LA INFECCION POR ROTAVIRUS EN UN MODELO MURINO DE VACUNACION INTRANASAL CON UN PEPTIDO SINTETICO DE VP6,** que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Mariana Bravo Vizuett. 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.

Atentamente

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:2024-12-03 18:25:23 | FIRMANTE

HxocyszXrMgHUwW+bNPgFjsRxUDna5sD19u30e/JKpuMnn/i47cEszaOd0BtHtsid/G7l6EETe2cYgOAE3PCU7CWxyfFOqGh9nvBy4kbXA3i2A5Gmn8OZDv50X86sTLUktZaNY+dQq2K2rCLXPGVdqhJTJukx9HspMOun5HqBZqypYz1qxPYIlRZku5TZQLMohXYoPMDAJKu5OMl2WC05ENDgJXKdE765IRdUs2ooLpMR7NE//7UWteq9acbNLoJ6Dj+sfKxVoJS9zmD5TZrZGpF0sBACHAiNmsx6A6AuvbIXC2ZHzXt7cbJr75EA8SiXFiGtSYABKmLaJQqF41//g==

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

WlgiajdzQ

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/nNIXm6U88ZU9IFNgHx5cel8xo46JWR3J

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE MEDICINA
Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 03 de diciembre de 2024.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **PAPEL DE LA INTEGRINA α4β7 EN LA PROTECCION CONTRA LA INFECCION POR ROTAVIRUS EN UN MODELO MURINO DE VACUNACION INTRANASAL CON UN PEPTIDO SINTETICO DE VP6,** que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Mariana Bravo Vizuett. 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.

Atentamente

Dra. María Angélica Santana Calderón

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

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2024-12-05 12:28:22 | FIRMANTE

yg8ph0D9yUCl1N8lRJuI4UOsKHxcklt8kHyzQJ3vxbDhCMGks1cWFdCX96Q7nb1Qr+ooURg9xauo++qFqqg4G05AC41h7CR/nK9rUBBy6ziEAsMbZE7fn5j/nMCsp4IfEiYr4D7Rel49AanJ+aZvs40W8v9eTCx4mC70jttc8UCD22nGTqE3eU/o0rCFUHKQE3IIvhaCIbeMwpocJGdwHMh0IlmOlfQ1BHVj+QwxXtIeGENgpfYOtsVQ9oKtIJFNbRj5E/KFxnNlXZJtR7Mht7+7R717Nw0DSNcjVnutBBQ+KYpeL/QtqEIxgnNwuo2j6uQ3NxkOaC6f+1AilRv0jg==

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

NaFEC3wgX

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/WrB0eyTFdLEMqNAJWHVaiFTFx8qg1eQX