



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRIA EN MEDICINA MOLECULAR
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO

**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE CÉLULAS Th EN UN MODELO
MURINO DE VACUNACIÓN INTRANASAL CONTRA ROTAVIRUS**

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN MEDICINA MOLECULAR**

QUE PRESENTA

Biól. YAEL HERNÁNDEZ GUADARRAMA

DIRECTOR DE TESIS

Dr. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA

Cuernavaca Morelos, México, 2022

Miembros del comité tutorial

- Tutor principal: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama (Facultad de Medicina - UAEM)
- Tutor personal: Dra. Gabriela Rosas Salgado (Facultad de Medicina - UAEM)
- Vocal 1: Dra. María Angélica Santana Calderón (CIDC - UAEM)
- Vocal 2: Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia (Facultad de Medicina - UAEM) †
- Vocal 3: Dra. Judith González Christen (Facultad de Farmacia - UAEM)

Miembros del jurado de examen

- Presidente: Dra. Gabriela Rosas Salgado
- Secretario: Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz
- 1er. Vocal: Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez
- 2do. Vocal: Dra. María Angélica Santana Calderón
- 3er. Vocal: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Fuentes de financiamiento

Este trabajo recibió apoyo de CONACyT a través del proyecto A1-S-27280 y del programa de becas CONACYT Nacionales 2020, para la obtención del grado de Maestra en el programa de Maestría en Medicina Molecular de la UAEM.

AGRADECIMIENTOS

Con total alegría y orgullo agradezco a mi familia, por apoyarme en cada meta que me he planteado hasta el día de hoy, por entender mis ausencias y tener el temple de acompañarme en mis momentos poco gratos. Agradezco que siempre estuvieron pendientes de mis logros y desaciertos, confortandome cuando lo necesite.

A mi director de tesis, Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo y abrirme las puertas del Laboratorio de Inmunología viral. Gracias por confiar en mi trabajo, por ayudarme a resolver mis dudas y brindarme las herramientas para mejorar en mi formación académica.

A la Dra. Vanessa López Guerrero, por compartir conmigo sus conocimientos y brindarme las bases de lo que iría desarrollando durante mi estancia de posgrado en esta institución.

Mi agradecimiento al comité tutorial, por la atención que brindaron al desarrollo de este proyecto de investigación, de mi formación como estudiante y por el tiempo que dedicaron para asistir a mis seminarios y realizar las observaciones pertinentes.

A mis compañeros de laboratorio, Abad, Alicia y Giovanna por recibirme de forma tan positiva cuando me integré al laboratorio de inmunología viral y por explicarme cuando requerí de su apoyo.

A todos mis compañeros y amigos, especialmente Diana, Hanna y Less, que sin importar que tan lejos estuviéramos o que tan poco nos veíamos, siempre y sin excepción, me impulsaron a dar lo mejor de mi.

A todos ustedes, mi mayor reconocimiento y gratitud.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	5
2. RESUMEN.....	7
3. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Rotavirus	9
1.1.1 Estructura viral.....	9
1.1.2 Clasificación de los rotavirus.....	13
1.1.3 Replicación.....	14
1.1.4 Patogenia	17
1.1.5 Epidemiología.....	19
1.2. Sistema inmune de las mucosas.....	22
1.2.1 GALT	23
1.2.2 NALT.....	25
1.3. Respuesta inmune contra la infección por Rotavirus	26
1.3.1 Respuesta inmune innata.....	26
1.3.2 Respuesta de células B.....	27
1.3.3 Respuesta de células T.....	28
1.4. Vacunas	29
4. ANTECEDENTES.....	32
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
6. OBJETIVOS.....	35
5.1. General.....	35
5.2. Particulares	35
7. HIPÓTESIS	35
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
8.1. Diseño experimental	36
8.2. Infección de ratones.....	37
8.3. Detección de rotavirus en las heces.....	37
8.4. Detección de IgA específica para rotavirus en las heces	38
8.5. Producción de anticuerpos monoclonales (Acm).....	38
8.6. Eliminación <i>in vivo</i> de las células Th.....	39
8.7. Obtención de células mononucleares de bazo y GLM	39
8.8. Obtención de linfocitos intraepiteliales.....	40
8.9. Tinción de células para citometría de flujo	41
8.10. Transferencia de células de bazo a ratones no inmunizados	41
8.11. Marcaje de células linfoides con CFSE	42
8.12. Análisis estadístico	42
9. RESULTADOS.....	43

7.1.	Los niveles de inmunoglobulinas séricas específicas para rotavirus, no se incrementan con la inmunización i.n. con el péptido VP6 ₂₈₉₋₃₀₂	43
7.2.	El Acm de rata GK1.5 específico para células T CD4 ⁺ de ratón elimina eficientemente a la población de células T CD4 ⁺ <i>in vivo</i>	44
7.3.	La eliminación de las células Th <i>in vivo</i> en ratones vacunados con el péptido VP6 ₂₈₉₋₃₀₂ elimina parcialmente la protección generada contra la infección por rotavirus.....	47
7.4.	Los anticuerpos IgA no son determinantes en la protección contra la infección inducida en ratones vacunados	49
7.5.	La inoculación i.p. de células de bazo de ratones inmunizados con VP6 ₂₈₉₋₃₀₂ , no protege a ratones naïve contra la infección por rotavirus	50
10.	DISCUSIÓN	54
11.	CONCLUSIÓN	58
12.	MODELO PROPUESTO	59
13.	PERSPECTIVAS	59
14.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. ABREVIATURAS

Acm	Anticuerpos monoclonales
AcNeu	Anticuerpos neutralizantes
Acp	Anticuerpo policlonal
APC	Células presentadoras de antígeno
APCp	Células presentadoras de antígeno profesionales
ARN	Ácido ribonucleico
ARNcs	Ácido ribonucleico de cadena simple
ARNdc	Ácido ribonucleico de doble cadena
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AS	Ácido siálico
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios
CCL25	Ligando de quimioquinas C-C motivo 25
CCR9	Receptor de quimiocinas C-C tipo 9
CD	Células dendríticas
CE	Células enterocromafines
CFSE	Éster de succinimidil-carboxifluoresceína
CT	Toxina de cólera
DLP	Partículas de doble capa
ESCRT	Complejo de clasificación endosomal para la maquinaria de transporte
GACVS	Comité Asesor Global sobre Seguridad de las Vacunas
GALT	Tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal
GEA	Gastroenteritis aguda
GLM	Ganglios linfáticos mesentéricos
HBGA	Antígenos del grupo sanguíneo del huésped
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
ILV	Vesículas intraluminales
i.n.	Inoculación intranasal
i.p.	Inoculación intraperitoneal

i.v.	Inoculación intravenosa
LIE	Linfocitos intraepiteliales
LP	Lámina propia
MAdCAM-1	Molécula 1 de adhesión celular de direccionamiento vascular de la mucosa
MALT	Tejido linfoide asociado a la mucosa
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NALT	Tejido linfoide asociado a la nasofaringe
NSP	Proteína no estructural
PP	Placas de Peyer
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RE	Retículo endoplásmico
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RIG-1	Gen I inducible por ácido retinoico
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero fetal bovino
Tc	T-citotóxicas
Th	T-cooperadoras
TLP	Partículas de triple capa
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
VCAM-1	Molécula 1 de adhesión celular vascular
VP	Proteína viral
5-HT	Serotonina

2. RESUMEN

Los rotavirus son uno de los principales agentes etiológicos de la gastroenteritis aguda y diarrea en la población infantil menor de 5 años y en adultos mayores en todo el mundo. A pesar de que en la actualidad se han introducido a nivel mundial dos vacunas contra el rotavirus, las infecciones que este virus causa siguen provocando altas tasas de mortalidad principalmente en países con bajos ingresos económicos. El péptido sintético con secuencia 289-302 de la proteína VP6 de rotavirus (VP6₂₈₉₋₃₀₂), un epítipo específico de células Th, restringido por la molécula de MHC clase II IE^d, es sumamente eficiente induciendo una respuesta protectora contra la infección por rotavirus a nivel intestinal, inoculado intranasalmente (i.n.).

Objetivo. Determinar el papel de las células Th en la protección inducida por el péptido sintético de VP6₂₈₉₋₃₀₂ administrado i.n. contra la infección por rotavirus.

Material y Métodos. Ratones BALB/c fueron inoculados i.n. dos veces con el péptido sintético VP6₂₈₉₋₃₀₂ en presencia de adyuvante. Se obtuvo suero pre-inmune y 21 días después de cada inoculación. La presencia de anticuerpos séricos anti-rotavirus se analizó por medio de ELISA. Veintiún días después de la segunda inoculación, los ratones fueron retados oralmente con el rotavirus murino EDIM. Durante los 8 días posteriores se colectaron las heces para determinar la carga viral y la presencia de anticuerpos IgA anti-rotavirus por medio de ELISA. Para determinar el papel de las células Th en la protección inducida, un grupo de ratones vacunados fue inoculado intraperitonealmente con un anticuerpo monoclonal (Acm) anti-CD4 de ratón, para eliminar esta población, y retado con el RV EDIM. La carga viral se comparó con la carga viral obtenida de los ratones vacunados o tratados con PBS. Para determinar si la protección por las células Th era transferible, células de bazo de ratones vacunados y recuperados de la infección fueron transferidas a ratones BALB/c naïve, 48 hrs después los ratones se infectaron con RV EDIM y se determinaron la carga viral y la presencia de anticuerpos IgA anti-rotavirus por medio de ELISA.

Resultados. La eliminación *in vivo* de las células Th en ratones vacunados i.n. con el péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂, eliminó cerca del 70% de la protección generada contra la infección por RV. Dicha protección fue independiente de anticuerpos IgA anti -RV intestinales. La transferencia i.p. o i.v. de células mononucleadas de bazo de ratones vacunados con el péptido a ratones naïve, al parecer no favoreció la migración hacia órganos linfoides secundarios o tejidos de la mucosa intestinal, por lo tanto, no transfirió la protección contra la infección por RV en ratones naïve.

Conclusión. Las células Th de memoria inducidas por una vacunación i.n. con el péptido sintético VP6₂₈₉₋₃₀₂ en presencia de CT, juegan un papel importante en la protección contra la infección por RV a nivel de la mucosa intestinal.

3. INTRODUCCIÓN

1.1. Rotavirus

Los rotavirus (RV) son uno de los principales agentes etiológicos de gastroenteritis aguda (GEA) infecciosa con diarrea grave y deshidratación, en niños menores de cinco años y adultos mayores en todo el mundo (Dennehy, 2015; Lestari, Vongpunsawad, Wanlapakorn, & Poovorawan, 2020; Lucero, 2014; Olaiz-Fernández et al., 2020; Troeger et al., 2018). Estos virus sin envoltura ingresan a las células usando diferentes tipos de endocitosis y, dependiendo de la cepa del virus, ingresan a diferentes compartimentos endosomales antes de salir al espacio citosólico (Arias, Silva-Ayala, & López, 2015; Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2009).

La infección y posterior multiplicación de RV se da como consecuencia de la ingesta del virus. La cápside externa del virión protege a la nucleocápside interna y el centro vírico del entorno, especialmente del entorno ácido del tubo digestivo (Murray et al., 2009).

A pesar de la introducción de dos vacunas contra el RV utilizadas a nivel mundial: la vacuna pentavalente, RotaTeq (Merck, EE. UU.) y la vacuna monovalente, Rotarix (GlaxoSmithKline, Bélgica), las infecciones por RV siguen provocando altas tasas de mortalidad (Crawford et al., 2017) en países con bajos ingresos económicos y son una causa importante de morbilidad en los países desarrollados (Gómez-Rial, Rivero-Calle, Salas, & Martín-Torres, 2020).

1.1.1 Estructura viral

Los RV, pertenecen a la familia *Reoviridae*, son virus icosaédricos, de ≈ 70 nm de diámetro, están constituidos por partículas carentes de cubierta lipídica, las cuales contienen un genoma de 18 kb de ARN de doble cadena (ARNdc) distribuido en 11 segmentos, que codifican para seis proteínas estructurales (VP); VP1 a VP7 y seis

proteínas no estructurales (NSP); NSP1 a NSP6 (Acosta, Calderón, Moreno, & Guerrero, 2009; Avendaño, Ferrés, & Spencer, 2011; López & Arias, 2020; Suzuki, 2019). El nombre de RV se deriva de la palabra latina *rota* que significa «rueda», en referencia al aspecto del virión por microscopía electrónica (Murray et al., 2009). En la Tabla 1 (Angel, Franco, & Greenberg, 2007; NCBI, 2016; Suzuki, 2019), se enlistan todas las proteínas del RV y sus funciones.

Tabla 1. Proteínas de RV.			
<i>Segmento genoma</i>	<i>Proteína codificada</i>	<i>Estructura viral</i>	<i>Función</i>
1	VP1	Núcleo	ARN polimerasa dependiente de ARN; forma un complejo de transcripción del virión con VP3; ubicado en el eje quintuple dentro de la cápside interna.
2	VP2	Cápside interna	Proteína estructural de la cápside interna; actividad de unión de ARN; necesaria para la actividad replicasa de VP1.
3	VP3	Núcleo	Guanilil-transferasa y metil-transferasa; forma un complejo de transcripción del virión con VP1.
4	VP4	Cápside externa	Antígeno de neutralización específico de tipo P; proteína de unión celular; infectividad mejorada por proteasa; determinante de virulencia; define la vía endocítica utilizada; la escisión por la tripsina en VP5 y VP8 aumenta la infectividad.
5	NSP1	No estructural	Proteína de unión a ARN; antagoniza eficazmente la señalización de IFN- α ; no esencial para la replicación en algunas cepas.

6	VP6	Cápside intermedia	Proteína principal del virion; antígeno de subgrupo; determinante de especie; protege el ARNdc de la neutralización intracelular durante la replicación del virus; necesaria para la actividad de transcripción de la DLP.
7	NSP3	No estructural	Inhibe la traducción de proteínas del huésped; se une al extremo 3' del ARNm de RV y al factor de elongación EIF4G1 involucrados en la regulación de la traducción.
8	NSP2	No estructural	NTPasa y helicasa; unión de ARNcs no específica; involucrado en la formación del viroplasma; se une a NSP5 y VP1; esencial para la síntesis de ARNdc.
9	VP7	Cápside exterior	Glicoproteína estructural de la cápside externa; antígeno de neutralización de tipo G; proteína transportadora de calcio transmembrana RER.
10	NSP4	No estructural	Enterotoxina viral; receptor glicoproteico para la gemación de las DLP a través de la membrana del RER; viroporina; modula los niveles de calcio intracelular y la replicación del ARN; papel en la morfogénesis de las TLP; producto de escisión secretado.
11	NSP5	No estructural	Esencial para la formación de viroplasmas y la replicación viral; unión a ARNcs; proteína cinasa; interactúa con NSP2 y NSP6; hiperfosforilada.
	NSP6	No estructural	Interactúa con NSP5; se localiza en el viroplasma.

RV está compuesto por una cápside de triple capa proteica que rodea el genoma viral. La capa más interna está constituida por la proteína VP2 (que engloba al genoma) y las proteínas VP1 y VP3 (asociadas al genoma). La proteína VP6, es la más abundante e inmunogénica y conforma la capa intermedia del virus, sobre la cual se ensambla la capa más externa. Las proteínas de la cápside más externa corresponden a las proteínas de superficie VP7, que forma la superficie lisa del virus, y por la proteína de espícula VP4, que funciona como la proteína de unión a la célula. La tripsina escinde VP4 en dos subunidades que da como resultado dos polipéptidos de menor peso molecular, VP8 y VP5, que forman parte de la partícula infecciosa. La escisión de VP4 es necesaria para que el virus entre en la célula (Figura 1) (Acosta et al., 2009; Arias et al., 2015; López & Arias, 2020).

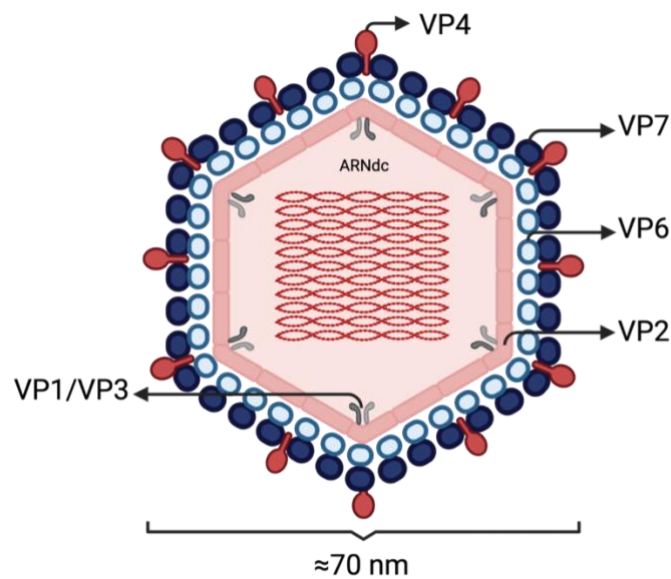


Figura 1. Esquema representativo de la estructura de RV. Se muestran las seis proteínas estructurales que integran la cápside icosaédrica del virus, compuesta por tres capas proteicas concéntricas, así como su genoma de ARN de doble cadena, distribuido en once segmentos que codifican para las proteínas estructurales y no estructurales del virus (Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

1.1.2 Clasificación de los rotavirus

A la fecha se han descrito 10 grupos principales de RV, denominados con las letras A-J (RVA-J), basados en la secuencia y en las características antigénicas de la proteína VP6 (Crawford et al., 2018; João et al., 2018; López & Arias, 2020), además de la movilidad electroforética de los segmentos del genoma. Actualmente, se han identificado cuatro grupos de RV patógenos para humanos, A, B, C y H (Mousavi-Nasab et al., 2020). El grupo A se caracteriza por ser el grupo de RV que mayor número de casos de gastroenteritis provoca, siendo responsable de cerca del 90% de las infecciones por RV en humanos (Gómez-Rial et al., 2020; Mousavi-Nasab et al., 2020).

La proteína VP6 de RV está muy conservada y los epítomos presentes en dicha proteína, se han utilizado también para clasificar a los RV del grupo A en subgrupos, dependiendo de la presencia o ausencia de ciertos epítomos, definidos por anticuerpos monoclonales (Acm), denominados antígenos de subgrupo (SG); por tanto, el virus puede pertenecer a SG, I, II, I/II o no I/II] (Esquivel, Lopez, Guitierrez-X, & Arias, 2000a; Estes & Cohen, 1989).

Existe también un sistema de tipificación dual, basado en la reactividad serológica y la variabilidad genética. Los serotipos se distinguen fundamentalmente por la secuencia de los genes que codifican para la glucoproteína de la cápside externa VP7 (serotipo G) y la proteína sensible a proteasa VP4 (serotipo P), siendo ambas el blanco de la acción de anticuerpos neutralizantes (AcNeu) (Martinez-Laso et al., 2009; Murray et al., 2009). De acuerdo a la base de datos del *Rotavirus Classification Working Group*: RCWG, actualmente se han identificado 36 serotipos G y 51 serotipos P de RV (RCWG, 2020) así como 27 genotipos G y 37 genotipos P (Mousavi-Nasab et al., 2020).

1.1.3 Replicación

El paso inicial en una infección viral es la unión del virus a receptores específicos en la superficie celular, una interacción que frecuentemente desencadena cascadas de señalización celular que facilitan la entrada o la replicación del virus. La unión del RV a las células huésped está mediada por receptores de unión en la superficie de la célula (Arias et al., 2015; Murray et al., 2009). Los viriones interactúan a través de la proteína de espícula VP4 con receptores celulares (receptores de unión), que contienen ácido siálico (AS) en posiciones terminales o sub-terminales (Suzuki, 2019).

Además del ácido siálico, se han reportado otras moléculas adicionales que están implicadas en la unión de RV con la célula hospedera, tales como, la proteína de choque térmico hsc70, la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 4\beta 1$ que además están involucradas en eventos post-unión y entrada del virus (Acosta et al., 2009; Lopez & Arias, 2006). En 2010 se reportó que algunas de las cepas de RV también dependían de la presencia de colesterol en la superficie celular durante la infección (Gutiérrez et al., 2010).

La unión de RV a la célula huésped también puede estar mediada por correceptores, incluidos los sialoglicanos, como los gangliósidos GM1 y GM1a y los antígenos del grupo sanguíneo del huésped (HBGA) (Arias et al., 2015; Crawford et al., 2018).

Una vez que se ha llevado a cabo la unión inicial con la célula huésped, la internalización del virus procede a través de una vía endocítica mediada por receptores. Las proteínas del complejo de clasificación endosomal requerido para la maquinaria de transporte (ESCRT) son mediadores potenciales directos de la remodelación de la membrana y tienen un papel importante en la formación de las vesículas intraluminales (ILV) (Calistri, Reale, Palù, & Parolin, 2021). Se ha sugerido que RV utiliza la maquinaria ESCRT durante su ciclo de vida, ya sea durante su

entrada en la célula hospedera o incluso durante su replicación y ensamblaje de la nueva progenie viral (Arias et al., 2015).

Independientemente de las moléculas celulares que las diferentes cepas de RV utilizan para unirse a la superficie celular y de la diferente vía endocítica que utilizan, el tráfico vesicular de las partículas de RV endocitados converge en endosomas tempranos (Silva-Ayala et al., 2013). Aquí se lleva a cabo la disgregación de las proteínas de la cápside externa debido a concentraciones bajas de Ca^{2+} para producir DLP (Acosta et al., 2009; Desselberger, 2014; Suzuki, 2019).

Algunas cepas de RV se trasladan desde los endosomas tempranos a los endosomas tardíos, que están enriquecidos en GTPasa Rab7, de esta forma las cepas que dependen de Rab7 para su infectividad pueden liberar sus DLP en el citosol (Arias et al., 2015).

Una vez en el citoplasma las DLP y las enzimas contenidas en el mismo inician la producción del ARNm. El ARNdc permanece siempre en el interior de las DLP. La transcripción del genoma se produce en dos fases, inicial y tardía. Cada una de las cadenas de sentido negativo de ARN, se emplea como molde por las enzimas del núcleo del virión, para sintetizar ARNm. Las enzimas virales, presentes en el interior del centro vírico, añaden una cabeza de 5'-metil-guanosina y una cola de 3'-poliadenilato. A continuación, el ARNm abandona la subpartícula viral y se traduce utilizando ribosomas de la célula huésped. Las proteínas del virión y los segmentos de sentido positivo de ARN se unen en estructuras similares a las DLP que se agregan para dar lugar a grandes inclusiones citoplásmicas. Los segmentos de ARN positivo se copian para producir ARN negativo y replican el genoma de ARNdc. Estos genomas virales, a su vez se asocian con las proteínas NSP1, NSP2, VP1, VP2, VP3 Y VP6, generando partículas nacientes sub-virales, denominadas partículas replicativas. La formación de estas estructuras sub-virales ocurre en zonas citoplasmáticas electrodensas, denominadas viroplasmas (Silva-Ayala et al., 2013).

En el proceso de ensamblaje, las DLP se asocian a la proteína vírica NSP4 en el exterior del retículo endoplásmico (RE), y adquieren sus proteínas de la cápside externa VP4 y VP7 después de penetrar por gemación al interior del RE (Crawford et al., 2017). La progenie viral es liberada al lumen intestinal por lisis celular (Figura 2) (Carballal & Oubiña, 2014; Murray et al., 2009).

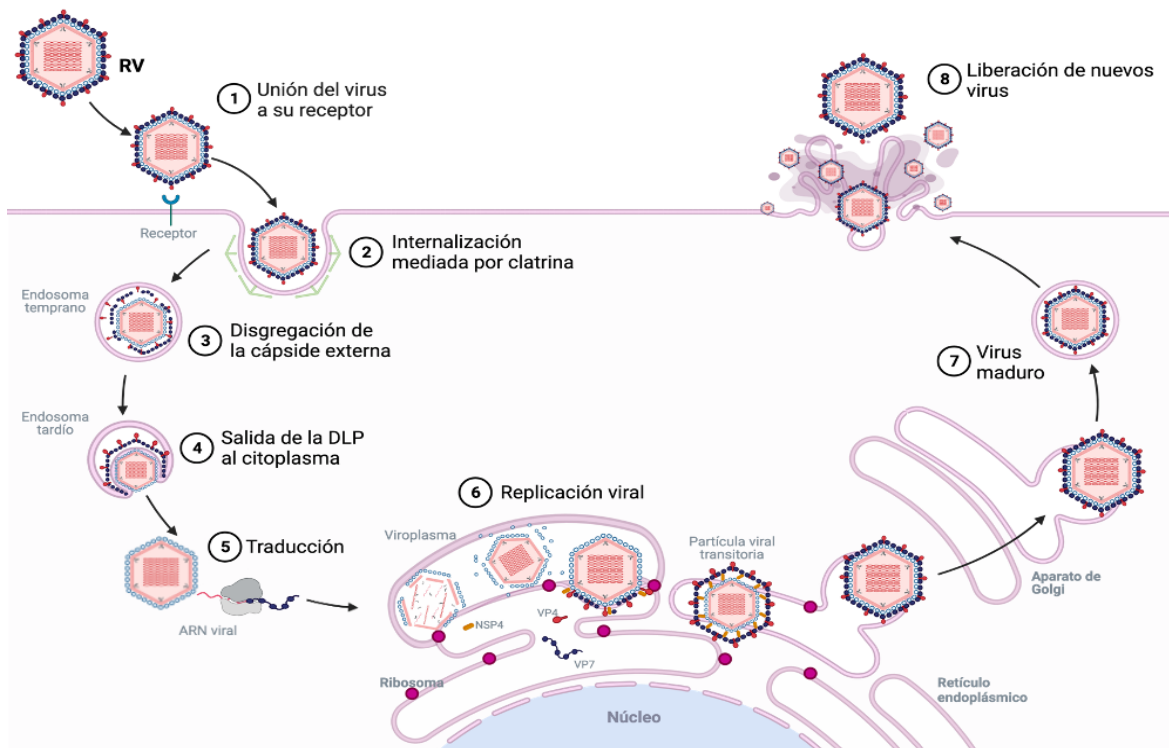


Figura 2. Representación esquemática del ciclo replicativo de RV. Después de la unión al receptor, los RV inician su internalización a la célula a través de los endosomas, en donde pierden la capa proteica externa y son liberados al citoplasma celular para iniciar su replicación. El ensamblado de las nuevas partículas virales inicia dentro del viroplasma y concluye en el RE. Finalmente el virus es liberado a la luz intestinal por medio de lisis celular (Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

1.1.4 Patogenia

La infección por RV en los humanos, produce un espectro de respuestas que pueden variar desde asintomáticas, leves o graves y dar lugar a una enfermedad deshidratante letal. El período de incubación es de menos de 48 horas con una aparición repentina de vómitos, una alta frecuencia de deshidratación y una duración media de la diarrea de entre 5-6 días (Hagbom, Sharma, Lundgren, & Svensson, 2012).

Los RV infectan principalmente a los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado (Lopez & Arias, 2006; Parashar, Bresee, Gentsch, & Glass, 1998), donde se puede observar vacuolización y pérdida epitelial, seguidas de hiperplasia de las criptas.

Aunque se ha reportado que la diseminación extraintestinal de RV puede ocurrir, la presencia del RV infeccioso en el suero y su diseminación sistémica no se observa con tanta frecuencia (Desselberger, 2014; Parashar et al., 1998). Sin embargo, en los huéspedes inmunodeprimidos, se ha descrito que el RV puede replicarse en el hígado, el sistema biliar y el páncreas y asociarse con atresia biliar y pancreatitis (Desselberger, 2014).

El estudio de las causas y el desarrollo de la enfermedad ocasionada por el RV ha permitido dilucidar su sintomatología. Las observaciones en torno a la infección, muestran que RV puede infectar a las células enterocromafines (CE) del intestino y estimular la producción de serotonina (5-hidroxitriptamina (5-HT)), lo que a su vez activa los nervios aferentes vagales y estimula las estructuras del tronco cerebral que controlan el vómito y la motilidad intestinal (Crawford et al., 2018; Desselberger, 2014; Hagbom et al., 2012).

La replicación viral puede secuestrar vías celulares, ocasionando la extrusión celular del epitelio intestinal. La pérdida de enterocitos infectados y la alteración

mediada por NSP4 de los importadores de solutos acoplados a sodio, reduce la función de absorción epitelial. Así mismo, NSP4 envía señales a través de la fosfolipasa C para aumentar los niveles de Ca^{2+} citoplasmático, activando los canales de cloruro dependientes del calcio y provocando una secreción excesiva de iones en la luz intestinal, dando lugar a la diarrea secretora (Figura 3) (Crawford et al., 2018).

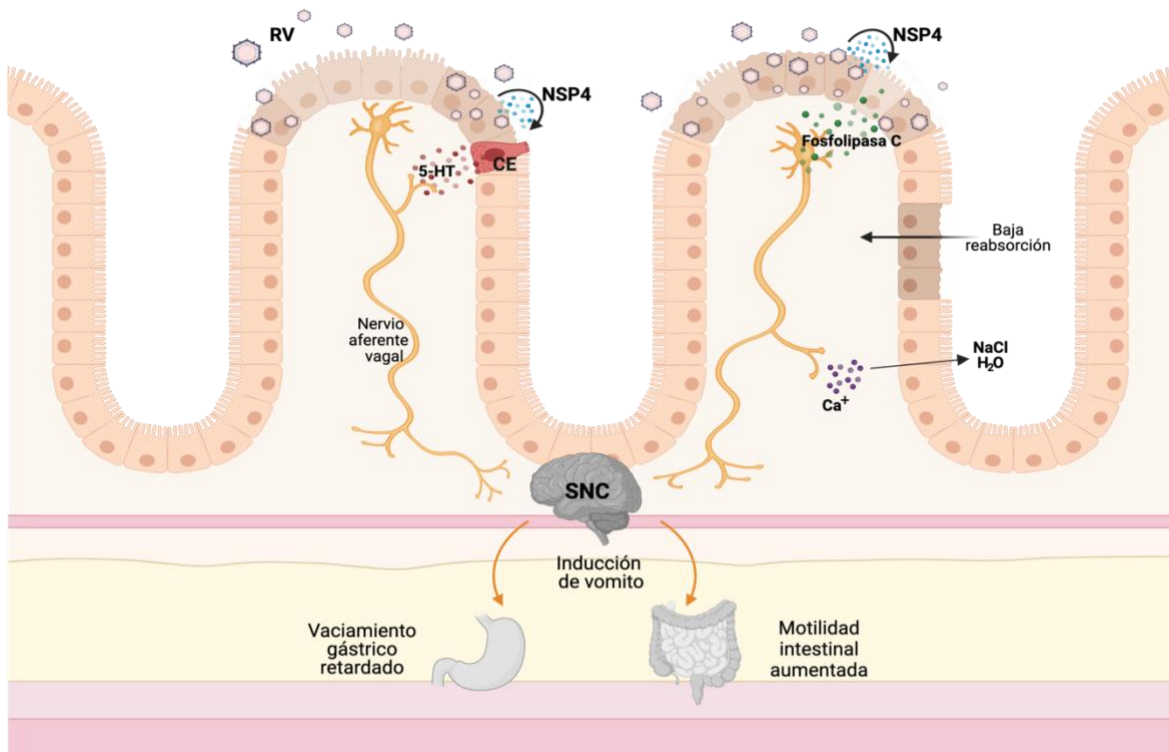


Figura 3. Esquema general de la patogenicidad de la infección por RV. Los RV infectan a los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado, su replicación favorece la secreción de NSP4, que conlleva a una secreción excesiva de líquidos a la luz intestinal, provocando diarrea. NSP4 también estimula la liberación de serotonina por células enterocromafines, induciendo vomito y aumentando la motilidad intestinal (Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

La enfermedad por RV presenta una patogenicidad de la enfermedad multifactorial, de la que dependen la edad del hospedador, la cepa responsable de la infección, y de la capacidad de replicación del virus (Desselberger, 2014). Aunado a esto, influye también el estado en que se encuentre el sistema inmunológico del hospedero.

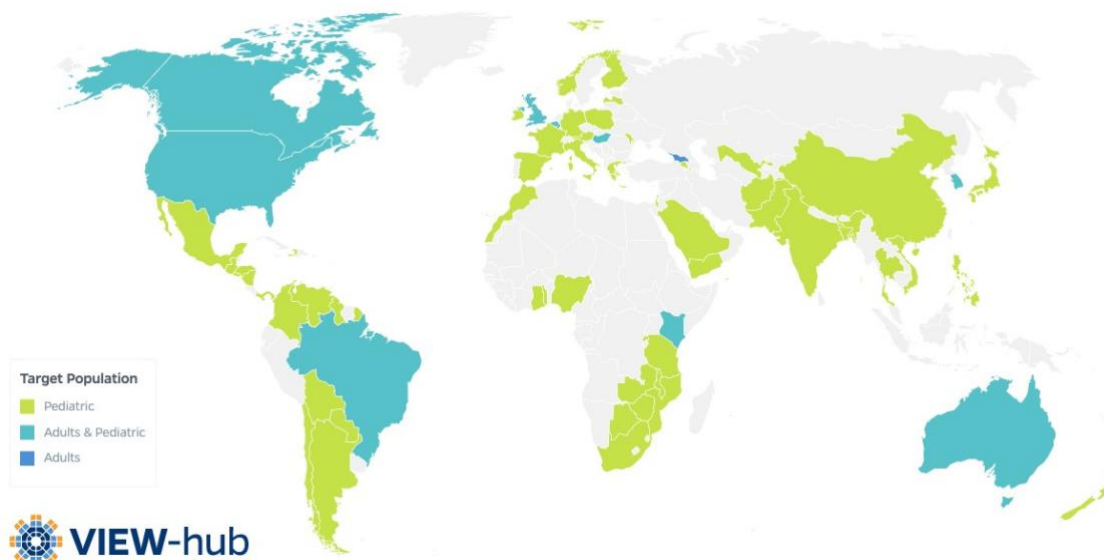
1.1.5 Epidemiología

Los RV son ubicuos (Lucero, 2014) y causan un alto número de casos en infecciones por gastroenteritis aguda en lactantes y niños menores de 5 años de edad ($\approx 30\%$ de la enfermedad por el RV es lo suficientemente grave como para requerir tratamiento en centros de atención primaria u hospitales) (Crawford et al., 2017; Desselberger, 2014).

Si bien la infección ocurre predominantemente en niños, los adultos pueden infectarse también (Figura 4) (Dennehy, 2015). Un estudio realizado por Troeger et al. 2018, reporta un total de 228 047 muertes por el RV a nivel global, de las cuales 128 515 fueron de menores de 5 años.

Aun con la introducción de las vacunas contra el RV en México, en el periodo comprendido entre 2008 y 2017, se registró un promedio de 8 489 muertes por diarrea, 7.53 defunciones por cada 100 000 niños menores de 5 años (Richardson-López Collada, Bautista-Márquez, Sánchez-Urbe, & Esparza-Aguilar, 2020).

RV ► Impact Studies ► Target Population



 **VIEW-hub**
by IVAC

June 28, 2022 © The International Vaccine Access Center (IVAC)

Figura 4. Distribución geográfica de las poblaciones con mayor susceptibilidad de contraer infecciones causadas por el RV infeccioso (Recuperado de view-hub.org).

Poco más del 90% de las infecciones mortales en niños que viven en países de bajos ingresos económicos, son causadas por RV. Esto probablemente se deba al acceso limitado a los servicios de atención médica, al bajo acceso a la terapia de hidratación disponible y a una mayor prevalencia de condiciones comórbidas (como la desnutrición), entre otros factores (Crawford et al., 2017).

El modo predominante de transmisión del RV es fecal-oral. También puede transmitirse de personas a persona o al tener contacto con objetos y superficies contaminadas, incluso se ha descrito que puede propagarse a través de secreciones respiratorias. La transmisión de animal a humano no parece ser común, aunque se han identificado cepas de RV humanos que poseen un alto grado de homología genética con las cepas animales (Dennehy, 2015; Murray et al., 2009; Parashar et al., 1998).

La infección por RV es altamente contagiosa, incluso un mismo individuo puede infectarse en diferentes ocasiones con diferentes cepas virales, ocasionando episodios repetidos de gastroenteritis durante sus primeros años de vida (Gómez-Rial et al., 2020).

A pesar de la gran diversidad genómica y antigénica de los RV a nivel mundial, solo un pequeño número de cepas de RV han prevalecido entre los seres humanos, representando aproximadamente el 90% de las infecciones a nivel mundial: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G8P[8], G9P[8] y G12P[8] (Crawford et al., 2018; Desselberger, 2014; Lee & Colgate, 2019; Raju, Parikh, Vetter, & Kolhapure, 2019).

Las cepas G9P[8] y G12P[8] han circulado con alta frecuencia, contribuyendo del 80 al 90% de todas las infecciones por RV en Norteamérica, Europa y Australia. Por

el contrario, en los países africanos, asiáticos y sudamericanos, otros genotipos como G5, G6 y G8 son más prevalentes (Desselberger, 2014).

Sin embargo, en México el genotipo G9, ya ha sido reportado como un genotipo de importancia en la infecciones por RV en niños menores de 5 años (Felix-Valenzuela, Cooley-García, Cano-Rangel, Durazo-Arvizu, & Mata-Haro, 2017; Guzman-Holst et al., 2021).

En China, Bangladesh y la India se han observado brotes de gastroenteritis aguda causados por RV del grupo B (RVB). Las infecciones por RVC son en su mayoría asintomáticas o clínicamente leves, pero pueden causar diarrea en adultos. Ya se han descrito también infecciones por RVH en humanos (Desselberger, 2014; Mousavi-Nasab et al., 2020).

Algunas causas de la alta tasa de contagios por RV pueden deberse a que no se necesita un número alto de partículas virales (menos de 100 partículas virales) para infectar productivamente a un individuo susceptible, quien una vez infectado, elimina partículas virales en grandes cantidades por medio de las heces (hasta 10^{11} partículas/mL) desde 2 días antes del inicio de la diarrea y hasta 10 días después del inicio de los síntomas (Dennehy, 2015; Desselberger, 2014; Parashar et al., 1998).

También podemos sumar a esto que las partículas de RV son muy resistentes a las condiciones ambientales, puede vivir en manos contaminadas durante horas y en superficies durante días (Dennehy, 2015).

Un panorama favorable contra las infecciones ocasionadas por el RV, es la introducción de las vacunas contra RV en los programas nacionales de inmunización (Raju et al., 2019).

1.2. Sistema inmune de las mucosas

La mayoría de los agentes infecciosos y ambientales, ingresan al cuerpo a través de las superficies epiteliales de nuestros tejidos mucosos. El sistema inmune asociado con los tejidos de la mucosa, denominado tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT), engloba una red compleja de componentes altamente especializados y compartimentalizados de la inmunidad innata y adaptativa (Punt, Stranford, Jones, & Owen, 2020; Sánchez Ramón, Manzanares, & Candelas, 2020). El MALT incluye el tejido linfoide asociado a la nasofaringe (NALT), a los bronquios (BALT), al tracto gastrointestinal (GALT), al tracto urogenital y a las glándulas exocrinas (Sánchez Ramón et al., 2020).

La respuesta inmune en las superficies mucosas se diferencia en sitios inductores y efectores, física y funcionalmente distintos. Las placas de Peyer (PP) del intestino delgado y las amígdalas son los sitios inductores más comunes, donde los antígenos estimulan las células B naïve a través de mecanismos dependientes e independientes de células T (Gesualdo, Di Leo, & Coppo, 2021).

Por otro lado, en los sitios efectores que están presentes en toda la mucosa (Gesualdo et al., 2021), se lleva a cabo la presentación de moléculas antigénicas, que han sido captadas y procesadas por las células presentadoras de antígeno profesionales (APCp), a los linfocitos T (Punt et al., 2020).

Se ha propuesto que el sistema inmune de las mucosas está interconectado, es decir, a pesar de que las superficies de este tejido se encuentran anatómicamente separadas, la inmunidad generada en determinado tejido de la mucosa, puede llevar a cabo una respuesta efectora en otro de los tejidos asociados a ésta.

Por ejemplo, las células T marcadas para su alojamiento en intestino delgado, expresan en su superficie las integrinas $\alpha_4\beta_7$ y el receptor de quimiocinas CCR9, que reconocen a sus moléculas ligando MAdCAM-1 (expresada preferentemente en

las células endoteliales asociadas al intestino), VCAM-1, (expresada en las células endoteliales en respuesta a citocinas) y CCL25, respectivamente (NCBI, 2016; Wiendl et al., 2021) lo que les permite migrar hacia otros tejidos de la mucosa.

De los tejidos linfoides de la mucosa, el NALT y el GALT contienen la mayor cantidad de linfocitos (Nagler-Anderson, 2001). El GALT, es el tejido inmunitario periférico más grande del cuerpo. La proporción de células linfoides que contiene es mayor que en el resto de los órganos linfoides secundarios (entre 60-70% de los linfocitos periféricos) (Nagler-Anderson, 2001; Ohno, 2015).

1.2.1 GALT

El tracto gastrointestinal se divide en varias estructuras linfoides organizadas que comprenden el GALT. Las células epiteliales intestinales, son el principal mecanismo de barrera contra patógenos, las uniones estrechas que existen entre células, sirven como el principal regulador de la función de barrera (Hagbom et al., 2020).

El epitelio también incluye una subpoblación de células T intercaladas en la capa epitelial denominada linfocitos intraepiteliales (LIE) (Ramiro-Puig, Pérez-Cano, Castellote, Franch, & Castell, 2008) que vigilan la barrera epitelial y participan en la defensa del huésped contra patógenos, en la reparación de daño y en las interacciones homeostáticas con el epitelio, la microbiota y los nutrientes (McDonald, Jabri, & Bendelac, 2018).

Debajo de esta capa epitelial, hay un estroma de tejido conectivo laxo llamado lámina propia (LP), que contiene una población residente de células linfoides, células plasmáticas, macrófagos, células dendríticas (CD) y eosinófilos. La LP del intestino delgado y grueso se drenan a través de vasos linfáticos que desembocan en los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM), donde las CDs estimulan a las células T y coadyuvan en la respuesta de las células. Los GLM son ganglios linfáticos

secundarios típicos con folículos de células B organizados y áreas de células T paracorticales (Berin & Chehade, 2010).

Otro sitio inductor de la respuesta inmune intestinal, son las PP. Estas son estructuras linfoides secundarias, similares a los ganglios linfáticos, que se encuentran distribuidas a lo largo del intestino dentro de la pared de la mucosa. Esto les permite estar en contacto directo con la luz intestinal, captando antígenos a través de unas células epiteliales especializadas llamadas células M. Los antígenos captados por las células M son transportados al interior de las PP donde son procesados y presentados a las células T y B (Berin & Chehade, 2010; Gesualdo et al., 2021). Posteriormente, estas células también viajan al GLM, en donde se concentran las respuestas contra antígenos captados en el epitelio intestinal o en las PPs.

Un aspecto importante de la respuesta intestinal es que las CD del intestino, a diferencia de las CD periféricas, producen ácido retinoico a partir de la vitamina A. El ácido retinoico induce la expresión de las integrinas de direccionalidad a intestino $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en los linfocitos T y B. Esto es importante, ya que una vez que estas células se concentran en los GLM, viajan por medio de la linfa e ingresan al torrente sanguíneo por la vena cava. Las células se distribuyen a nivel sistémico y a otros sitios efectores de mucosas, pero con un tropismo preferente para la LP intestinal. Una vez en la LP, las células B se pueden diferenciar a células plasmáticas productoras de IgA y las células T pueden migrar al epitelio intestinal por medio de las integrinas $\alpha E\beta 7$ (Nagler-Anderson, 2001).

Además de las PP, el intestino contiene estructuras más pequeñas llamadas folículos linfoides aislados, cada uno de los cuales contiene un solo folículo de células B con un epitelio folicular suprayacente (Figura 5) (Berin & Chehade, 2010; Ramiro-Puig et al., 2008). Hasta la fecha no se ha dilucidado el papel que juegan las células B de los folículos aislados en la respuesta inmune intestinal.

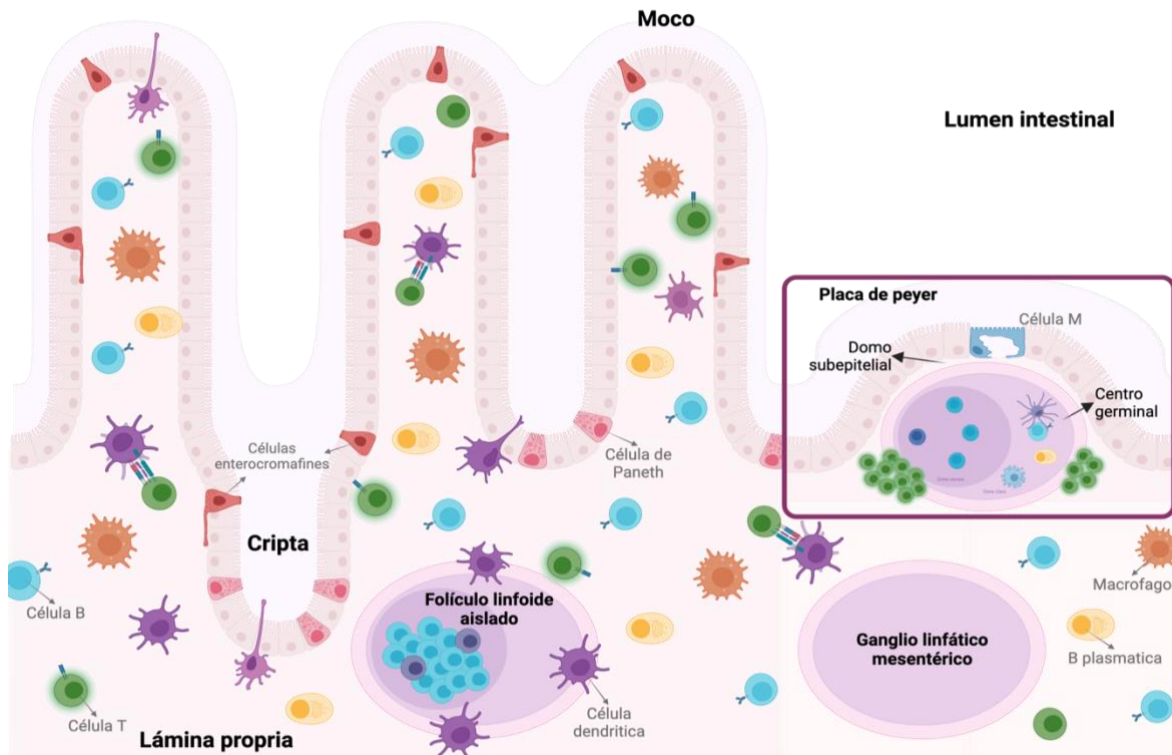


Figura 5. Representación esquemática del GALT. Se muestran los sitios inmunitarios inductores: folículo linfático aislado, folículo linfático asociado (como las PP) y GLM; así como la parte efectora de la respuesta inmunitaria integrada por poblaciones de linfocitos T (verde) y B (azul), células plasmáticas (amarillo), células dendríticas (fucsia) y macrófagos (lila) que se encuentran de forma difusa a lo largo de la lámina propia intestinal (Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

1.2.2 NALT

El NALT es el primer tejido inmunitario expuesto a antígenos y patógenos inhalados. Se encuentra en el lado de la cavidad nasal del paladar superior en roedores, el equivalente al anillo de Waldeyer y las amígdalas adenoides, tubáricas, palatinas y linguales en humanos. A diferencia de otros sitios de la mucosa, el NALT se desarrolla después del nacimiento y su formación está limitada a la presencia o ausencia de patógenos (Takaki, Ichimiya, Matsumoto, & Seya, 2018).

Los linfocitos B y las células mieloides son las células inmunitarias que se expresan con mayor frecuencia en las amígdalas (Gesualdo et al., 2021).

La superficie del NALT está compuesta por un epitelio que se extiende alrededor de los folículos y se prolonga profundamente en las amígdalas para formar criptas, en donde se crea una asociación linfoepitelial entre el epitelio y el parénquima amigdalario. Aquí, hay una sobreexpresión de células presentadoras de antígeno (APC), como las CD o las células M, ubicadas en el epitelio que recubre el NALT (Gesualdo et al., 2021), las cuales procesan los antígenos inhalados, lo que resulta en su presentación a las células B y T.

Después de la activación de las células T, se forma un entorno rico en citocinas que promueve el cambio de clase a inmunoglobulina A (IgA) en las células B y la maduración por afinidad en los centros germinales. De esta forma las células T activadas y las células B plasmáticas llevan a cabo su acción efectora específica de antígeno. Por lo tanto, se considera que el NALT es el sitio inductor de la respuesta inmune de la mucosa en el tracto respiratorio superior (Takaki et al., 2018).

Interesantemente, la presentación de antígeno por las CD a las células T en el NALT, al igual que en GALT, puede inducir la expresión de las integrinas $\alpha 4\beta 7$ y de CCR9 por lo que la estimulación de estas células en NALT pueden inducir respuestas en GALT y viceversa (Ciabattini et al., 2011).

1.3. Respuesta inmune contra la infección por Rotavirus

1.3.1 Respuesta inmune innata

La susceptibilidad a la infección por RV está modulada tanto por factores no inmunológicos (como la presencia de ácido gástrico y la expresión diferencial de receptores de RV, como HBGA, en el intestino) como por factores inmunológicos. Los RV son inicialmente reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en enterocitos o células del sistema inmunológico incluidos macrófagos, células dendríticas o células B y células T adaptativas (Crawford et al., 2017).

Los PRR mejor caracterizados que tienen un papel en el reconocimiento de RV, probablemente son RIG-I (gen I inducible por ácido retinoico, DDX58), la enzima helicasa de ARNdc y MDA5 codificada por el gen IFIH1 (Interferón inducido con helicasa C dominio 1), los cuales inician respuestas de IFN tipo I y tipo III (Crawford et al., 2017).

Otros PRR incluyen los receptores tipo Toll (TLR) implicados en el reconocimiento de RV. El ARNdc de RV puede ser reconocido por TLR3 y los dominios NACHT, LRR y PYD que contienen la proteína 9B (un componente del inflamasoma). Se cree que estos PRR desempeñan un papel en la resistencia dependiente de la edad a la enfermedad por RV en ratones, ya que ambas proteínas se expresan en niveles más altos en animales adultos (Crawford et al., 2017).

A pesar de los mecanismos de respuesta inmunitaria innata, los RV han desarrollado múltiples mecanismos para evadir la inmunidad innata mediada por interferón (Angel, Franco, & Greenberg, 2012), por ejemplo, la degradación de IRF3 y el bloqueo de la traslocación de NF- κ B por NSP1, o la inhibición de la función de las proteínas STAT1 y STAT2. También, se ha demostrado que RV estimula la secreción de TGF- β , lo que inhibe la capacidad de las DC's para activar células T (Angel et al., 2012; Franco-Cortés, 2016; Holloway, Truong, & Coulson, 2009).

1.3.2 Respuesta de células B

La IgA es el isotipo de anticuerpo más abundante que se encuentra en el cuerpo y tiene un papel importante en las respuestas inmunitarias en las superficies mucosas del tracto gastrointestinal, respiratorio y urogenital. Interviene en su función efectora a través de múltiples mecanismos, al impedir la adhesión de partículas virales a células epiteliales de la mucosa, por la unión a un receptor o unión a antígenos de alta y baja afinidad (Blutt, Miller, Salmon, Metzger, & Conner, 2012).

Con base en estudios realizados en ratones, se han observado respuestas tanto a nivel sistémico (células B que expresan inmunoglobulina A y G, presentes en el bazo y la médula ósea) como en la mucosa intestinal (muy probablemente células B productoras de IgA polimérica en las PP y la LP), contra la infección por RV (Franco, Angel, & Greenberg, 2006).

Anteriormente se ha descrito que la IgA intestinal específica de RV es señal de protección contra la infección (Blutt et al., 2012). La administración oral de RV, en dosis múltiples de las vacunas actualmente disponibles, puede activar selectivamente la producción de IgA en el intestino, donde ocurre la infección, sin embargo no queda claro el papel de la IgA en la protección contra la infección, ya que no se ha demostrado que la protección conferida por la vacunación, corresponda a un nivel dado de AcNeu (Skansberg, Sauer, Tan, Santosham, & Jennings, 2021).

1.3.3 Respuesta de células T

Los recién nacidos tienen una alta susceptibilidad a infecciones que conduce a altas tasas de morbilidad y mortalidad. Esto se debe en parte a una respuesta deficiente de las células T CD4⁺ neonatales, lo que conduce a una producción deficiente de anticuerpos y una producción baja de IFN- γ , lo que resulta en una eliminación deficiente de patógenos intracelulares (Labastida-Conde et al., 2018).

Las células T son importantes para la inmunidad antiviral. En modelos de estudio en ratones, se ha observado que las células T CD4⁺ son esenciales para el desarrollo de más del 90% de la IgA intestinal específica de RV y, por lo tanto, su presencia parece crítica para el establecimiento de respuestas protectoras de memoria a largo plazo (Crawford et al., 2017; Franco et al., 2006; Laban et al., 2022). Las células T CD8⁺ específicas de RV murino están implicadas en la resolución oportuna de la infección primaria por RV y pueden mediar la protección parcial a corto plazo contra la reinfección (Franco et al., 2006).

En el año 2018, se reportó que la vacunación con una cepa inactiva de RV, en ratón, es capaz de inducir la proliferación de células T que expresan el receptor de alojamiento en el intestino LPAM-1 (o integrina $\alpha_4\beta_7$), y que estas células inmunitarias, tienen un papel importante en la eliminación de infecciones intestinales (Resch et al., 2018).

1.4. Vacunas

Uno de los principales desafíos en el desarrollo de una vacuna eficaz contra la infección por RV es la variabilidad de las proteínas de la cápside externa del virus. En los seres humanos existen diferentes serotipos G y P de RV, de importancia epidemiológica, por lo que es necesario el desarrollo de una vacuna, que tenga el potencial para inducir una respuesta inmunitaria protectora heterotípica (Esquivel et al., 2000a).

Actualmente además de las vacunas Rotarix (GlaxoSmithKline) y RotaTeq (Merck), disponibles en el mercado global desde hace más de una década (Lappalainen et al., 2015; Skansberg et al., 2021), han obtenido autorización nacional las vacunas Rotavac (Baharat Biotech) y Rotasiil (Serum Institute of India) en India (Raju et al., 2019; Skansberg et al., 2021) y ha sido precalificada por la OMS la vacuna Rotavin-M1 (PolyVac), autorizada y fabricada en Vietnam (Skansberg et al., 2021). Sin embargo, las infecciones por RV siguen teniendo altas tasas de mortalidad de niños menores en todo el mundo cada año, con una carga desproporcionadamente alta en países de ingresos bajos y medio bajos, donde el acceso a la atención médica es limitado (Figura 6) (Varghese, Kang, & Steele, 2022).

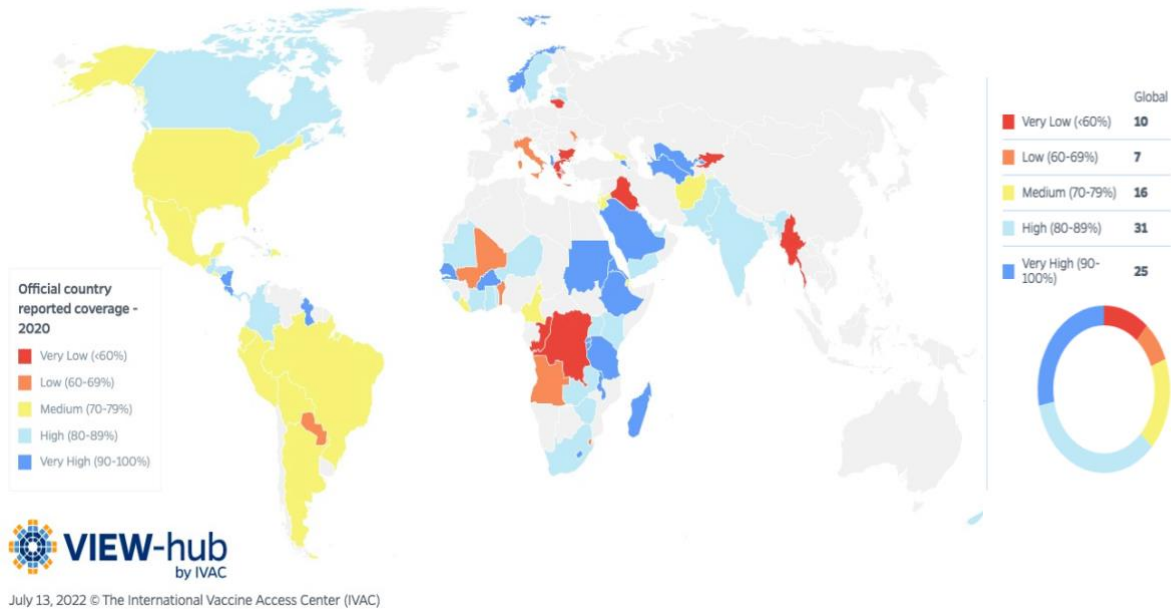


Figura 6. Cobertura oficial de las vacunas contra el RV. Cada color muestra el porcentaje (%) aproximado de la cobertura reportada por los países con acceso a las vacunas.

En 2011, una revisión de seguridad de las vacunas Rotarix y RotaTeq por parte del Comité Asesor Global sobre Seguridad de las Vacunas (GACVS), concluyó que ambas vacunas tenían un buen perfil de seguridad, sin embargo, datos obtenidos en Australia y EE. UU., dieron a conocer que estas vacunas pueden estar asociadas con un aumento de hasta 6 veces el riesgo de invaginación intestinal después de la primera dosis de vacuna en algunas poblaciones. Esto podría reflejar las limitaciones de los sistemas de vigilancia que conducen a algunos sesgos no controlados (por ejemplo, diferencias en las pruebas de diagnóstico y definiciones de casos en diferentes entornos) (World Health Organisation, 2014).

En general, los hallazgos siguen siendo tranquilizadores ya que el riesgo de invaginación intestinal por las vacunas actuales contra el RV, sigue siendo pequeño en comparación con los beneficios de prevenir el impacto de la diarrea grave (World Health Organisation, 2014). Ante todo, es importante que la introducción de vacunas

contra RV se acompañe de estudios de vigilancia de modo que los beneficios y riesgos se puedan determinar con evidencia relevante.

La proteína viral VP6, es una proteína altamente conservada entre las diferentes cepas secuenciadas de RV, con una identidad global que va del 87 al 99%. Esta proteína es un antígeno diana de las células T-cooperadoras (Th) heterotípicas y las células T-citotóxicas (Tc). Además, las células Th inducidas *in vivo* después de inmunizar con VP6, puede ayudar en la producción de AcNeu. Por lo tanto, VP6 parecería ser un buen candidato para usarse como vacuna o incluirse en una formulación de vacuna (Esquivel et al., 2000a).

4. ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, la proteína VP6 de RV, que conforma la capa intermedia del virión, es la más conservada entre las diferentes cepas virales y es altamente inmunogénica, induciendo tanto células T como B (Ward & McNeal, 2010).

Esto claramente indica que VP6 es un excelente candidato para el diseño de una vacuna heterotípica. De esta manera, estudios previos mostraron que cuando los ratones fueron inoculados i.n. con VP6 en presencia de un adyuvante, se indujo una protección contra la infección mayor al 90% (Choi et al., 2002). Esta protección fue independiente de IgA y totalmente dependiente de células Th (Choi et al., 2002; McNeal et al., 2006).

Además, se demostró que la protección correlacionaba con la producción de IFN- γ e IL-17 por células Th intestinales. Sin embargo, cuando se vacunaron ratones deficientes en los receptores para una u otra citocina, no se abrogó la protección (Smiley et al., 2007). Estos datos sugieren que las citocinas necesitan funcionar en conjunto para generar la protección o existe otro factor involucrado que no ha sido descrito.

Asimismo, se ha demostrado que VP6 también puede inducir protección contra la infección por RV administrado parenteralmente como vacuna de ADN (Lopez-Guerrero et al., 2018), proteína purificada (Pastor et al., 2014; Tamminen, Lappalainen, Huhti, Vesikari, & Blazevic, 2013) o dirigida a células dendríticas por medio de Acm (Badillo-Godinez et al., 2015), en presencia o en ausencia de adyuvante. Aunque en estos casos no se determinaron los mecanismos de protección, es muy probable que fueran por células T.

Por otro lado, Esquivel et al., 2000, estudiaron si la proteína interna VP6 de RV podría usarse para mejorar la producción de AcNeu contra las proteínas externas,

de la cápside de RV (VP7 y VP4). Concluyendo que la VP6 puede generar una respuesta mejorada de AcNeu contra RV de forma homotípica y heterotípica, a través del mecanismo de ayuda intermolecular por parte de las células Th hacia las células B.

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se demostró, usando un hibridoma de células Th, que el péptido de VP6 289 a 302 (VP6₂₈₉₋₃₀₂) (RLSFQLVRPPNMTP), que es reconocido en el contexto de la molécula IE^d del MHC de clase II (Baños, Lopez, Arias, & Esquivel, 1997), es un epítipo de células Th. Este péptido está altamente conservado en la mayoría de las cepas de RV reportadas.

Trabajos posteriores, demostraron que la protección inducida por VP6 podría ser emulada vacunando ratones i.n. con el péptido sintético, en presencia de toxina de cólera como adyuvante (Choi et al., 2000, 2003), induciendo una protección contra la infección por RV arriba del 90%. Como se esperaba, esta protección fue dependiente de células Th y probablemente independiente de anticuerpos, sin embargo, hasta el momento no se han definido claramente los mecanismos por los cuales los linfocitos Th inducen esta inmunidad.

Este modelo es una excelente herramienta para estudiar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la inducción de una respuesta inmune protectora en el NALT que actúa a nivel de epitelio intestinal, ya que se genera una respuesta inmune de linfocitos Th RV específicos (dirigidos exclusivamente hacia el péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂), facilitando de esta manera el análisis de la respuesta.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inmunización es una historia de éxito mundial en materia de salud y desarrollo. Las vacunas reducen los riesgos de contraer enfermedades al inducir una respuesta inmunitaria que permite al organismo generar memoria inmunológica contra patógenos.

Por ello, se considera a la inmunización como un componente clave de la atención primaria de salud y un derecho humano indiscutible. Sin embargo, a pesar del enorme progreso, es necesario comprender mejor los mecanismos que inducen la respuesta inmune protectora contra los antígenos.

Esto con la finalidad de generar, vacunas o formulaciones de vacunas, que mimeticen la acción de un patógeno y permitan al organismo generar una respuesta inmune sin causar un daño mayor.

Con el modelo de vacunación i.n. con el péptido sintético VP6289-302 de RV, nos proponemos estudiar cómo las células Th péptido específicas inducidas en NALT ejercen su acción efectora para eliminar la infección intestinal ocasionada por RV.

Los resultados de este trabajo coadyuvarán en el entendimiento de la respuesta inmune de mucosas, en la posible implementación de vacunas de nueva generación contra RV y en el diseño de vacunas e inmunoterapias para patologías intestinales, como cáncer y procesos inflamatorios.

6. OBJETIVOS

5.1. General

Determinar el papel de las células Th en la protección inducida por el péptido sintético de VP6₂₈₉₋₃₀₂ administrado i.n. contra la infección por rotavirus.

5.2. Particulares

- Analizar el efecto de la eliminación de las células Th *in vivo* en ratones vacunados con el péptido sobre la protección contra la infección por rotavirus.
- Determinar si las células Th de memoria de ratones vacunados con el péptido son capaces de transferir la protección contra la infección a ratones no vacunados.

7. HIPÓTESIS

La inoculación i.n. con el péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂, inducirá una respuesta de células Th de memoria capaz de proteger contra la infección por rotavirus a nivel intestinal.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Diseño experimental

Grupos de 3-4 ratones hembras BALB/c (H-2^d) de 5 a 6 semanas de nacidos libres de patógenos del bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM (Bioterio de la Facultad de Medicina, UAEM), fueron inoculados i.n. con 50 µg del péptido sintético VP6₂₈₉₋₃₀₂ (RLSFQLVRPPNMTP) en presencia de 2.5 µg de CT (toxina de cólera) (Sigma) como adyuvante o con CT sola como control, y mantenidos en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UAEM.

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 RV EDIM. Se eliminó la población de las células Th con un Acm específico o usando un Acm control de isotipo, para determinar el papel de estas células en la protección inducida (Figura 7a).

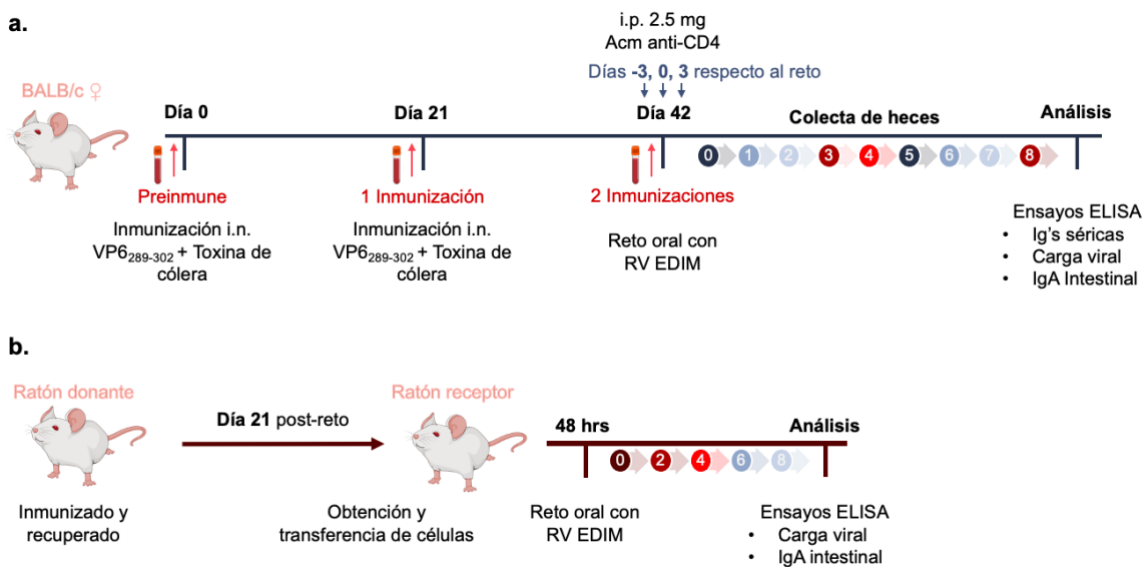


Figura 7. Esquema gráfico del diseño experimental general.

Por otro lado, en un nuevo grupo de experimentos, veintiun días posteriores al reto con el RV EDIM, se obtuvieron las células mononucleares de bazo de los ratones inoculados con el Acm control de isotipo (del experimento antes descrito) y se transfirieron a ratones naïve para determinar si estas células podían transferir protección contra la infección por el mismo patógeno (Figura 7b).

8.2. 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 RV. Enseguida se administraron 100 µl de DMEM sin suero con 1×10^4 uff del RV silvestre EDIM (100DI₅₀).

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 heces los días 0 al 8 post-infección para determinar los niveles de virus excretados, como parámetro de replicación viral. La protección se midió utilizando la siguiente formula:

$$\bar{X} = \left\{ 1 - \left(\frac{\text{carga viral de ratones vacunados}}{\text{carga viral de ratones no vacunados}} \right) \right\} \times 100$$

8.3. Detección de rotavirus en las heces

Las muestras de heces de cada ratón fueron almacenadas a -20 °C del día 0 hasta el término del experimento, el día 8 post-infección. Posteriormente, estas fueron resuspendidas al 5 % (peso/volumen) en el siguiente buffer: 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ (PH 7.4), 5 % suero fetal bovino (SFB), 0.05 % Tween-20, 10 mM azida de sodio. Las muestras resuspendidas en este buffer se almacenaron a 4 °C toda la noche, para permitir su disgregación.

La carga de las partículas virales presentes en el sobrenadante de la suspensión de las heces se evaluó por un ensayo de ELISA de captura (Esquivel et al., 2000a). Como anticuerpo de captura se utilizó un anticuerpo policlonal (Acp) hiperinmune de cabra contra varias cepas de RV producido en este laboratorio y como anticuerpo de detección un Acp hiperinmune contra el RV de simio RRV producido en conejo.

El ensayo se reveló con un Acp contra inmunoglobulina G (IgG) de conejo marcado con fosfatasa alcalina (Zymed, San Francisco) y se leyó en un lector de ELISA a 405 nm.

8.4. Detección de IgA específica para rotavirus en las heces

Las mismas muestras de heces que se utilizaron para la detección de la carga viral, fueron usadas para determinar las IgA específicas para RV.

Así, la presencia de IgA intestinal específica de RV presente en el sobrenadante de la suspensión de las heces se evaluó por un ensayo de ELISA de captura (Esquivel et al., 2000a). Como anticuerpo de captura se utilizó el Acp hiperinmune de cabra contra RV, seguido de un lisado de células MA-104 infectadas con RV RRV. Posteriormente, se adicionaron los sobrenadantes de las heces y el ensayo se reveló con un Acp contra IgA de ratón marcado con peroxidasa de rábano (Abcam). La absorbancia se leyó en un lector de ELISA a 450 nm.

8.5. Producción de anticuerpos monoclonales (Acm)

Los hibridomas de rata GK 1.5 anti-CD4 de ratón (IgG2a) y el control de isotipo III-10 anti-hapteno NP (IgG2a) se inocularon intraperitonealmente (i.p.) en ratones desnudos (nu/nu) de 6 a 8 semanas de nacidos (Bioterio de la Facultad de Medicina) para producir líquido ascítico rico en estos anticuerpos.

Primeramente, se inocularon i.p. 150 μ L de Pristane (2,4,6,19,14 tetrametilpentadecano) (Sigma) para acondicionar la cavidad peritoneal de los ratones. Dos semanas después se inocularon i.p. de 2 a 5 x 10⁶ células de los hibridomas en PBS y después de 3 semanas se colectó el líquido ascítico por medio de una punción i.p. con una aguja de calibre 18G.

El ascites se colectó en un tubo de 15 mL y se centrifugó a 2000 rpm a 4 °C. Se colectó el sobrenadante, tratando de evitar la capa superior de grasa, y se almacenó a -20 °C hasta su uso. La concentración de proteína se realizó por el micrométodo de BCA (Pierce).

8.6. Eliminación *in vivo* de las células Th

Ratones vacunados fueron retados oralmente con el RV EDIM y se les inoculó i.p. entre 1-5 mg de ascites del anticuerpo GK1.5 anti-CD4 a los días -3, 0 y 3 respecto al reto con ayuda de una jeringa de insulina con aguja 32 G. Como control, otro grupo de ratones fue inoculado con 30-150 μ g de del anticuerpo control de isotipo III-10 purificado.

La carga viral fue evaluada como previamente se describió para determinar si la eliminación de la población de células Th modifica la protección inducida. La eliminación de las células T CD4⁺ se confirmó por citofluorometría de flujo con anticuerpos específicos usando células de bazo y LIE.

8.7. Obtención de células mononucleares de bazo y GLM

Para obtener las células del bazo y los GLM, los órganos fueron extirpados y colocados por separado en placas de Petri de 100 mm de diámetro con 10 mL de medio de cultivo RPMI (GIBCO) suplementado (glutamina 2 mM, 2- β -mercaptoetanol 5 x 10⁻⁵ M, gentamicina 10 μ g/mL y SFB al 10%).

Los órganos se disgregaron con ayuda de un émbolo de jeringa y una laminilla metálica y las células se colectaron en tubos de 15 mL respectivamente. Después de centrifugar a 1500 rpm/5 min/4° C, el pellet se resuspendió en 2 mL de cloruro de amonio 150 mM, después de 2 min se paró la reacción de lisis con 5 mL de medio RPMI, las células se centrifugaron bajo las mismas condiciones, se resuspendieron en 2 mL de medio RPMI y se contaron usando azul de tripano y una cámara de Neubauer.

8.8. Obtención de linfocitos intraepiteliales

El intestino de ratones inoculados i.p. con 2.5 mg de ascites del anticuerpo GK1.5 anti-CD4 a los días 0, 3 y 6, fue extirpado y depositado en una caja Petri bacteriológica de 100 mm de diámetro con PBS frío.

Posterior a una serie de lavados se removieron las placas de Peyer y se realizó un corte longitudinal y después varios transversales para obtener piezas de 5 a 10 mm de largo. Los trozos de intestino se incubaron en 30 mL de medio RPMI (GIBCO) suplementado (SFB 5%, EDTA 0.5 M, DTT 1M, glutamina 2 mM y gentamicina 10 µg/mL) por 40 min/ 37° C en agitación. A continuación, el intestino se filtró en tubos de 50 mL con ayuda de una rejilla de 75 micras, la solución obtenida se centrifugo a 2000 rpm/5 min/4° C, las células se resuspendieron en 8 mL de percoll al 36%. Se hicieron gradientes con percoll al 67% y al 36%, que contenían las células, y se centrifugaron a 50 G/30 min.

La banda de linfocitos intraepiteliales se colectó cuidadosamente en un tubo de 50 mL, las células se aforaron con PBS y se centrifugaron a 3000 rpm/10 min/ 4° C. El pellet se re-suspendió en 5 mL de PBS y se contaron usando azul de tripano y una cámara de Neubauer.

8.9. Tinción de células para citometría de flujo

Se transfirió un volumen equivalente a 1×10^6 células a un tubo eppendorf de 1.5 mL, las células se centrifugaron a 1500 rpm/5 min/4° C, se resuspendieron con la dilución correspondiente de anticuerpo (Cuadro 1) y se dejaron incubar por 20 min/4° C; posteriormente, las células se centrifugaron a 1500 rpm/5 min/4° C y se lavaron con 200 μ l de buffer FACS (Azida de sodio 0.05%, EDTA 0.2 mM, SFB 2%, PBS).

Finalmente, las células se resuspendieron en 100 μ l de buffer FACS y 100 μ l de paraformaldehído al 4% 20 min/4° C. Las células se almacenaron a 4° C protegidas de la luz hasta su análisis.

Cuadro 1. Plan de tinción			
Anticuerpo	Clona	Concentración	Dilución utilizada
Anti-CD4-FITC	RM4-4	0.5 mg/mL	1:100
Anti-CD3-APC	145-2C11	0.2 mg/mL	1:300
Isotipo-FITC	eBRG1	0.5 mg/mL	1:200
Isotipo-APC	eBR2a	0.2 mg/mL	1:200

8.10. Transferencia de células de bazo a ratones no inmunizados

Para evaluar la capacidad que tienen las células Th péptido específicas de transferir la protección contra la infección por RV, 2 ratones fueron inoculados vía i.p., uno con 2×10^7 células de bazo en un volumen final de 500 μ L y otro con PBS solo como control.

Dos días posteriores a la transferencia, los ratones se infectaron con el RV EDIM y se evaluó la replicación viral a lo largo de 8 días post-infección, como se indicó previamente, con intervalos de 2 días por colecta. Asimismo, se determinó la presencia de IgA anti-RV en las heces.

8.11. Marcaje de células linfoides con CFSE

Un volumen equivalente a 2×10^7 células de bazo y GLM fue transferido a un tubo de centrifuga de 1.5 mL y se adiciono CFSE (éster de succinimidil-carboxifluoresceína) a una concentración de 10 μ M/20 min/37° C, las celulas se lavaron dos veces y se resuspendieron en RPMI.

8.12. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron al menos en 2 o 3 ocasiones de manera independiente. Los datos obtenidos se procesaron en el programa Microsoft Excel y se expresaron como la media \pm desviación estándar. La significancia de la diferencia entre los grupos experimentales se determinó a través de un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

9. RESULTADOS

7.1. Los niveles de inmunoglobulinas séricas específicas para rotavirus, no se incrementan con la inmunización i.n. con el péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂

Una manera indirecta y rápida para determinar la inmunogenicidad del péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂ administrado i.n. es a través de la presencia de inmunoglobulinas (Ig's) en sangre periférica. De esta manera, los niveles de Ig's anti-VP6 fueron evaluados en sueros de ratones pre-inmunizados e inmunizados con una y dos dosis i.n. del péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂ en presencia de CT como adyuvante.

Los resultados no mostraron diferencia entre los sueros pre- y post-inmunización en comparación con el control (Figura 8). Este resultado podría explicarse por el hecho que el péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂ es un epítipo de células Th (Baños et al., 1997) y por lo tanto no es reconocido por las células B.

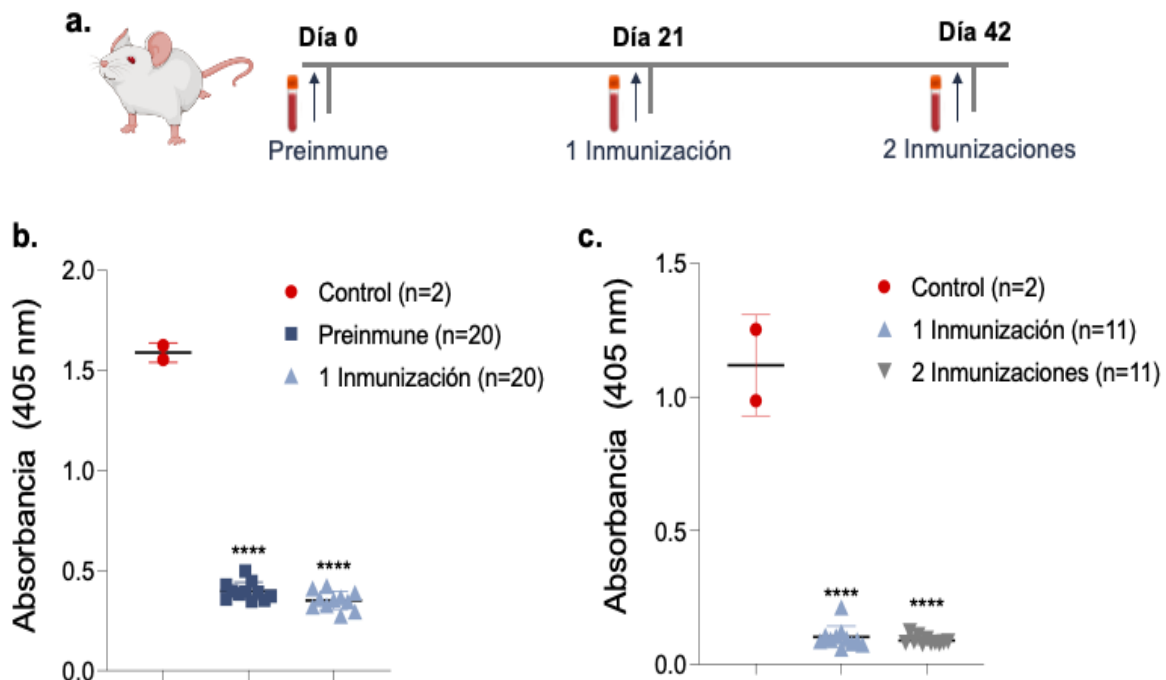


Figura 8. Determinación de Ig's séricas anti-VP6 en ratones vacunados con el péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂. a. Esquema representativo de los días en que se tomaron las muestras de sangre. Un día antes

de la primera dosis (Preimmune), 21 días después de la primera dosis (1 inmunización); 21 días después de la segunda dosis (2 inmunizaciones). **b.** Nivel de Ig sérica de ratones preinmunizados y con una sola inmunización. **c.** Nivel de Ig sérica de ratones con una o dos inmunizaciones. Como control positivo se usó un suero proveniente de ratones infectados con el RV EDIM. La presencia de anticuerpos contra VP6 fue analizada con un ensayo de ELISA de captura, usando un lisado de células MA-104 infectadas con el RV RRV como antígeno. El ensayo se reveló con un Acp de cabra anti-Ig's de ratón marcado con fosfatasa alcalina. La absorbancia se midió a 405 nm. Se muestran el promedio y la s.d. de cada grupo de tratamiento. **** $p < 0.0001$ vs control.

7.2. El Acm de rata GK1.5 específico para células T CD4⁺ de ratón elimina eficientemente a la población de células T CD4⁺ *in vivo*

Una manera de determinar el papel de las células Th en la protección inducida por la vacunación con el péptido sintético, es eliminando a esta población *in vivo* por medio de un Acm específico para la molécula CD4. De esta manera, se montaron las condiciones de este experimento usando líquido ascítico rico en el Acm de rata anti-CD4 de ratón. Tres ratones BALB/c fueron inoculados i.p. con 1, 2.5 o 5 mg de ascites a los días 0, 3 y 6; como control, se inoculó un ratón i.p. con 500 μ l de PBS. Dos días después de la última inoculación con el Acm, se extrajo el bazo de cada ratón para poder obtener las células mononucleares, mismas que fueron teñidas con Acm's específicos para las moléculas CD3 y CD4 de ratón marcados con fluorocromos y se analizaron por citometría de flujo.

Como se observa en la figura 9 todos los ratones inoculados con el Acm, mostraron una reducción de la población de células Th en bazo de más del 99% en comparación con el control.

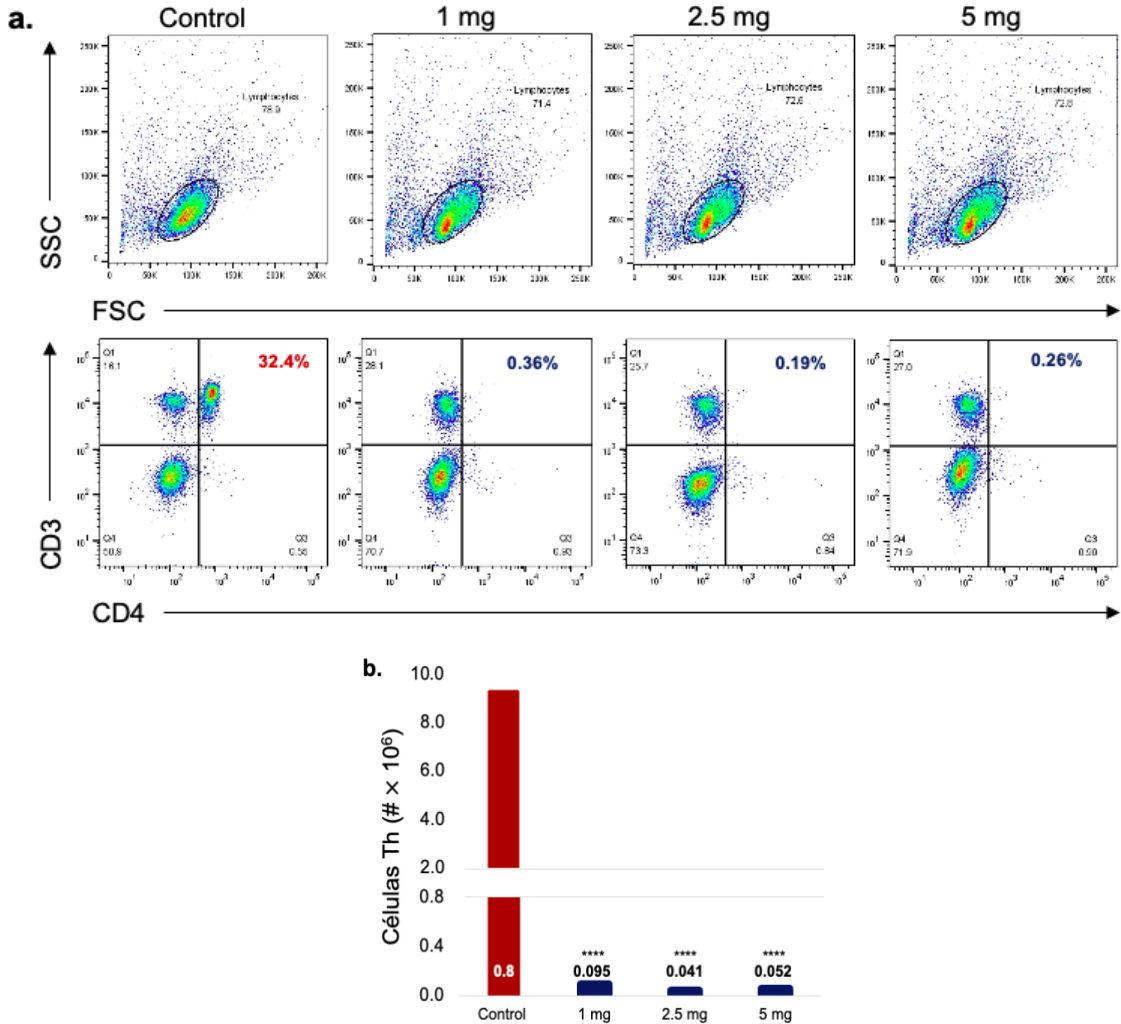


Figura 9. El Acm de rata anti-CD4 de ratón elimina más del 99% de la población de células Th de bazo. a. Los recuadros superiores muestran la población de células linfoides analizadas, los recuadros inferiores muestran el porcentaje de los linfocitos Th (n=1). **b.** Número total de células Th en bazo. Se utilizó el software FlowJo para generar los gráficos de la citometría. **** p<0.0001 vs control.

Con base en el experimento previo, se determinó el uso de 2.5 mg de ascites para realizar experimentos posteriores de eliminación de células Th. De esta forma, dado que la protección contra la infección se lleva a cabo en el epitelio intestinal, se decidió analizar si esta dosis también elimina a las células T CD4⁺ en el compartimiento intraepitelial. Por lo tanto, un ratón fue tratado con 2.5 mg del Acm (como se describió antes) y como control se inoculó un ratón con PBS. Dos días

después de la última inoculación se obtuvieron las células de bazo y los LIE, que posteriormente se tiñeron con Acm específicos para las moléculas CD3 y CD4 de ratón.

Los resultados de dos experimentos independientes mostraron una disminución de entre 58 y 98% de la población de células Th de LIE (Figura 10a), en comparación con una reducción de más del 99% de la población de células Th de bazo (Figura 10b), que para este experimento se consideró como control positivo de eliminación. Este resultado indica que el Acm GK.1 específico para CD4 de ratón puede emplearse de manera eficiente para la eliminación de más del 50 % de la población de células Th de LIE y casi el 100% de la población de linfocitos Th de bazo.

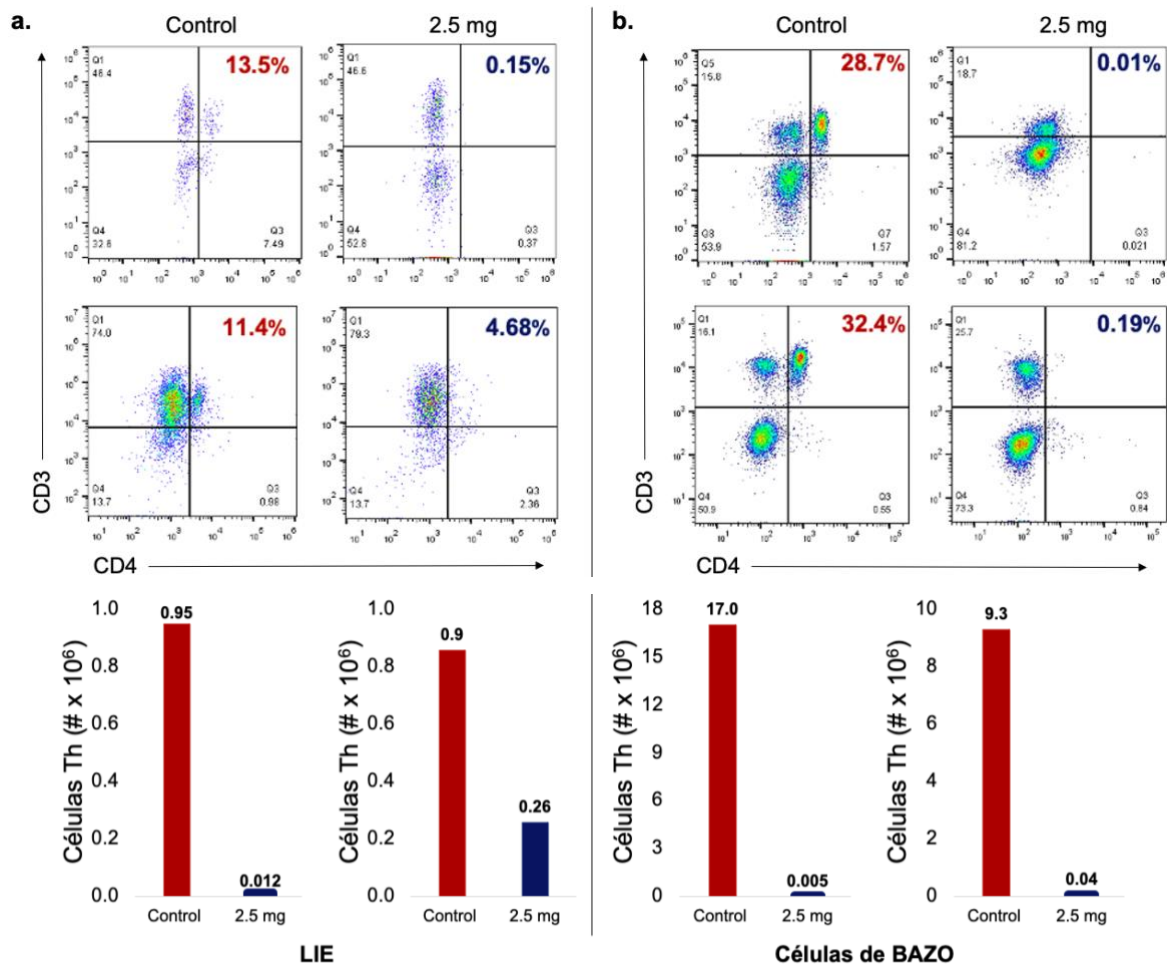


Figura 10. El Acm de rata anti-CD4 de ratón elimina más del 50% de la población de células Th en LIE. Porcentaje y número total de células Th en ratones tratados con el Acm anti-CD4 de ratón o con PBS como control. **a.** LIE intestinales de ratón. **b.** Células mononucleares de bazo de ratón. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes (n=1). Se utilizó el software FlowJo para analizar las lecturas de la prueba y generar los gráficos presentados.

7.3. La eliminación de las células Th *in vivo* en ratones vacunados con el péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂ elimina parcialmente la protección generada contra la infección por rotavirus

Debido a que se ha reportado que la protección inducida por la proteína VP6 es independiente de IgA intestinal (Choi et al., 2002; McNeal et al., 2006) y a que el péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂ es un epítipo de células Th (Baños et al., 1997), era muy probable que las células Th tuvieran un papel importante en la protección inducida por el péptido en este modelo. De esta manera, se analizó el efecto de la eliminación de células T CD4⁺ en ratones inmunizados i.n. con el péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂ en presencia de CT como adyuvante (Choi et al., 2000, 2003).

Así, grupos de ratones fueron inoculados i.n. dos veces con el péptido más CT. Como control, un grupo de ratones fue inoculado solamente con CT. Veintiún días después de la segunda inoculación, los ratones fueron retados oralmente con el RV EDIM. En el caso de los ratones vacunados con péptido, se inocularon i.p. con PBS, con 2.5 mg de ascites rico en el anticuerpo de rata anti-CD4 de ratón GK 1.5 o con 30 µg de anticuerpo de rata control de isotipo, a los días -3, 0 y 3, respecto al reto con el RV.

Se realizaron 4 experimentos independientes (Figura 11a) y, como se esperaba, los ratones vacunados e inoculados i.p. con PBS o con el Acm anti-isotipo de rata, mostraron una protección contra la infección del 93.9% y 91.3% respectivamente (Figura 11b) con respecto a los ratones no vacunados. Sin embargo, los ratones vacunados e inoculados i.p. con el Acm anti-CD4 de ratón, mostraron una gran

variación entre los 4 experimentos realizados ya que se obtuvieron 46.5, 0, 44.1,y 4% de protección.

Los valores de la segunda repetición, no se incluyeron en el promedio de los experimentos porque claramente hubo un problema experimental ya que la protección se mantuvo muy similar a los ratones no tratados. De esta manera, el promedio de protección del resto de experimentos fue del 31.5% (Figura11b), es decir, la protección disminuyó en más del 50% respecto al grupo control no vacunado. Este resultado indica que las células T CD4⁺ tienen un papel importante en la protección contra la infección por RV en nuestro modelo de vacunación i.n. con el péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂.

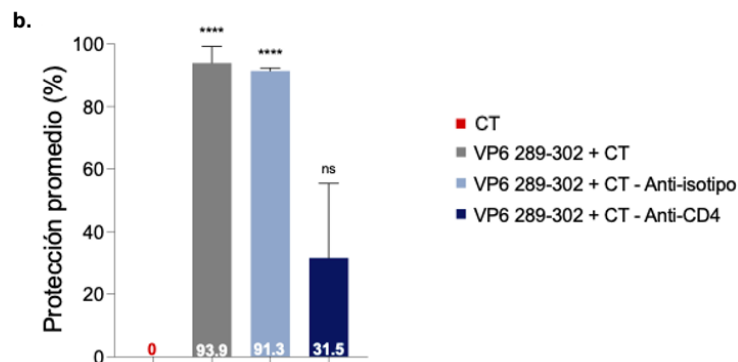
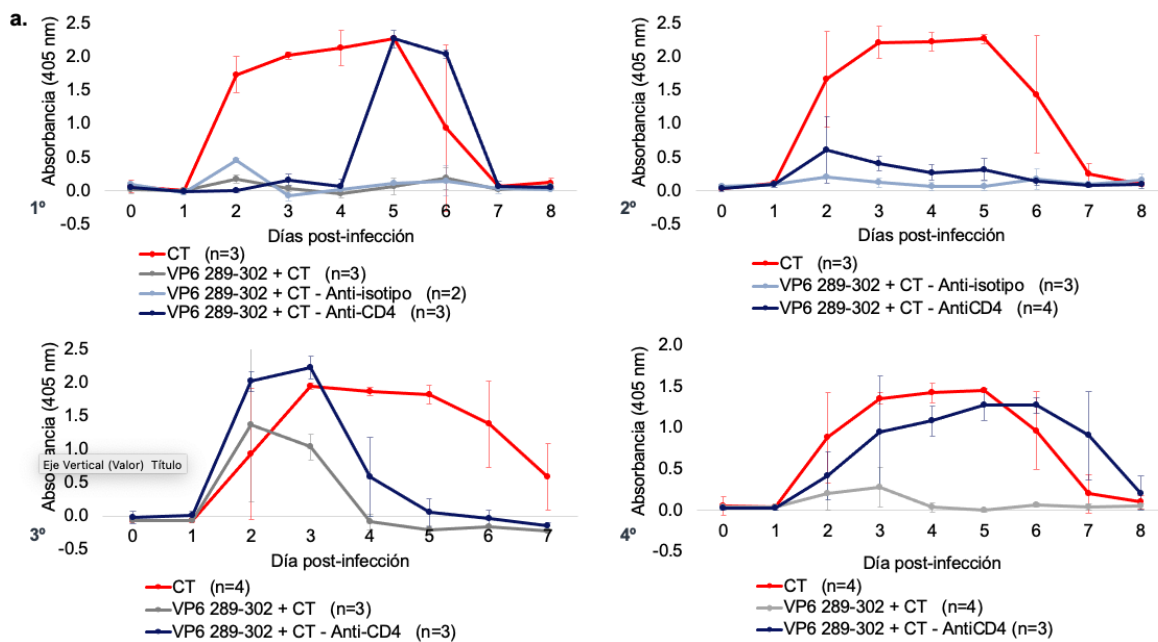
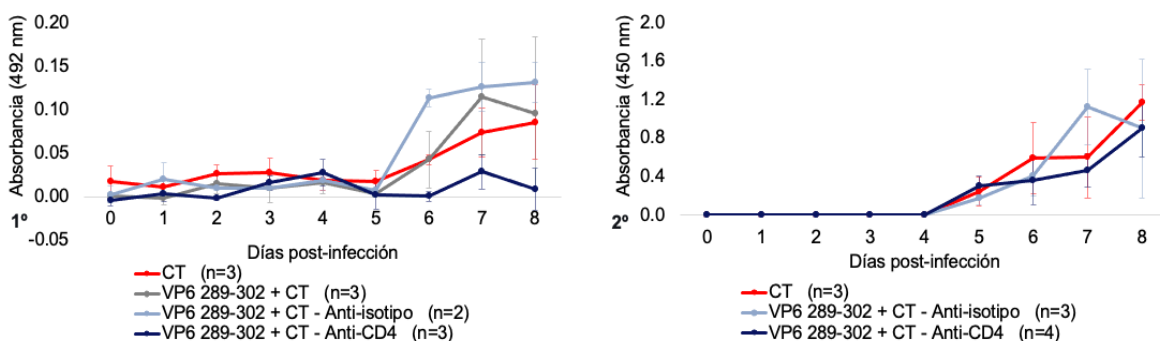


Figura 11. Las células Th juegan un papel importante en la protección inducida por el péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂. **a.** Cinética de la carga viral de ratones infectados con el RV EDIM. **b.** Promedio del porcentaje de protección de ratones inmunizados, **** p<0.0001 vs control. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes. Como control positivo se usó un lisado de células MA-104 infectadas con el RV RRV.

7.4. Los anticuerpos IgA no son determinantes en la protección contra la infección inducida en ratones vacunados

Para verificar que los niveles de anticuerpos IgA anti-RV intestinales no correlacionan con la protección observada en los ratones vacunados con el péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂, se determinó por medio un ensayo de ELISA de captura, la IgA anti-RV presente en las heces de los ratones con los tratamientos descritos en los experimentos anteriores.

Como se puede observar en la figura 12, tanto los ratones inmunizados con péptido + CT como los inoculados solo con CT, y posteriormente retados con el RV EDIM, tuvieron una cinética similar de producción de IgA anti-RV a partir del día 6, día en que empieza a decrecer la carga viral en los ratones control, o prácticamente se ha eliminado el virus en el caso de los ratones vacunados (Figura 12). La misma cinética se observó en los ratones vacunados y tratados i.p. con el Acm anti-CD4 o anti-isotipo. Este resultado corrobora que no hay una relación entre los niveles de anticuerpos IgA anti-RV intestinales y la protección contra la infección inducida por la inoculación i.n. del péptido VP6₃₈₉₋₃₀₂.



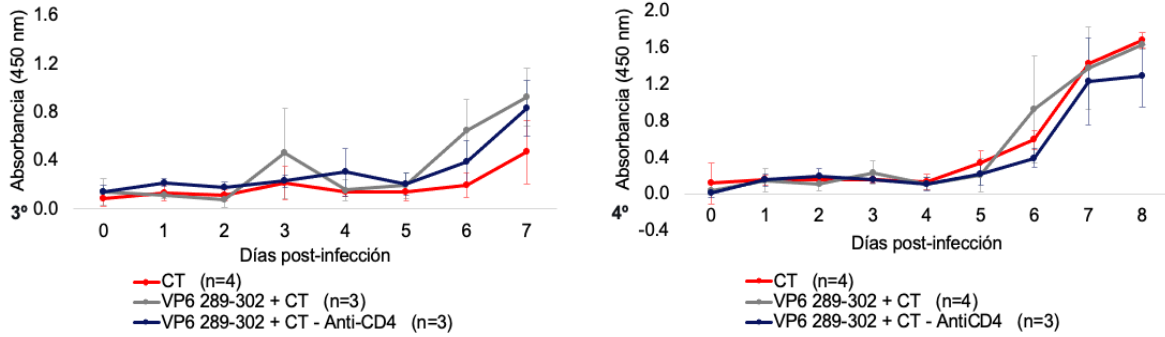


Figura 12. Los anticuerpos IgA intestinales específicos de RV, pueden detectarse a partir del día 6 post-infección, cuando el virus se ha eliminado casi por completo. Cinética de la producción de IgA intestinal específica de RV en ratones infectados con el RV EDIM. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes. Como control positivo se usó suero de ratón del día 21 post-infección. Para el primer ensayo se utilizó el sustrato OPD (o-diclorhidrato de fenilendiamina) detectable a 492 nm y para el resto se utilizó el sustrato TMB (tetrametilbencidina) detectable a 450 nm.

7.5. La inoculación i.p. de células de bazo de ratones inmunizados con VP6₂₈₉₋₃₀₂, no protege a ratones naïve contra la infección por rotavirus

Para evaluar si la inmunidad generada por la inmunización i.n. con VP6₂₈₉₋₃₀₂ en ratones podía ser transferida a ratones naïve, extrajimos las células de bazo de ratones BALB/c inmunizados y recuperados del reto contra RV. Inoculamos i.p. ratones BALB/c con 2×10^7 células de bazo con medio RPMI. El grupo control fue inoculado solamente con RPMI. Cuarenta y ocho horas después de la inoculación de las células, los ratones fueron retados con el RV EDIM y se colectaron las heces del día 0 al 8 post-infección, con intervalos de dos días por colecta.

Los resultados no mostraron una protección contra la infección por RV en los ratones que recibieron la transferencia celular (Figura 13a). Asimismo, la cinética de producción de IgAs anti-RV fue similar entre los ratones transferidos y no transferidos (Figura 13b). Estos resultados sugieren que las células de bazo transferidas no tuvieron efecto sobre la respuesta inmune anti-RV.

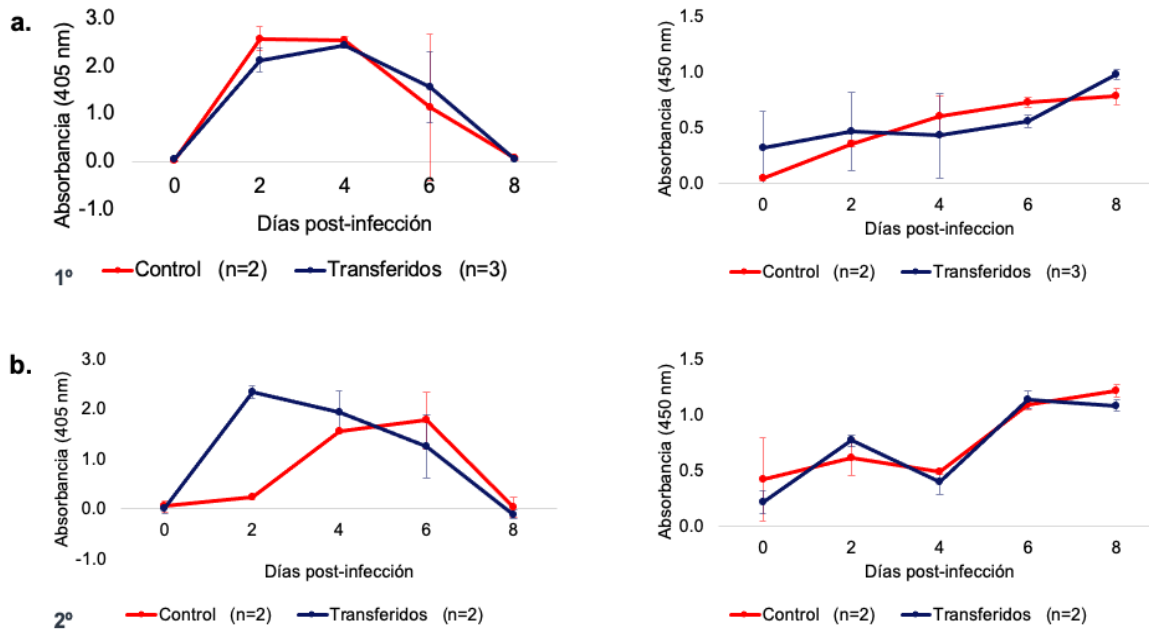


Figura 13. No se observó protección contra la infección por RV en ratones que recibieron transferencia celular. a. Cinética de la carga viral en heces de ratones infectados con el RV EDIM. **b.** Cinética de la producción de IgA intestinal específica de RV en ratones infectados con el RV EDIM. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes. La carga viral y la producción de IgA se determinó mediante un ensayo de ELISA de captura utilizando los Ac antes descritos.

Para tratar de dilucidar porqué las células de bazo de ratones vacunados y retados con RV (que contienen células Th de memoria) no transfirieron protección contra la infección por RV en ratones naïve, se montaron las condiciones experimentales para evaluar qué porcentaje de células del ratón donante (RD) llegan al bazo y los GLM de los ratones receptores (RR). De esta forma, dos ratones naïve fueron inoculados vía i.p. o vía intravenosa (i.v.) respectivamente, con células mononucleares de bazo de ratones vacunados y retados con RV teñidas con CFSE. Cuarenta y ocho horas después de la inoculación se extrajeron las células del bazo y los GLM de los RR para su análisis por citometría de flujo.

Los resultados del ensayo mostraron un porcentaje casi nulo de células CFSE positivas en el bazo y los GLM de los RR (Figura 14). Estos resultados muestran que la transferencia, ya sea vía i.p. o vía i.v. de las células de bazo (incluyendo

células Th de memoria), podría no favorecer su migración a los sitios efectores de la mucosa y por tanto no hay una transferencia de protección contra la infección.

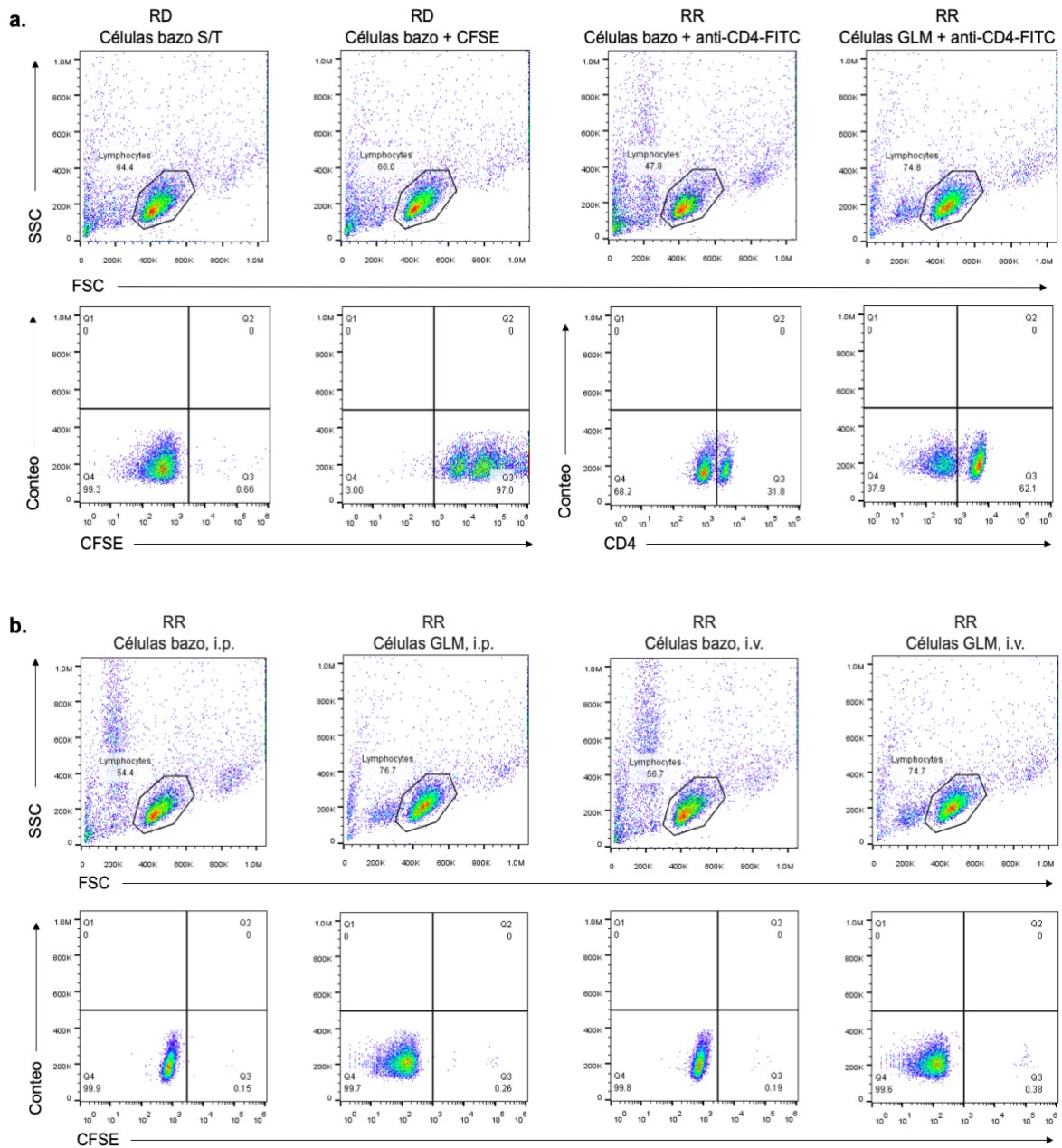


Figura 14. La transferencia vía i.p. o vía i.v. de células T de memoria, no favorece su llegada a los sitios efectores. Se muestran los resultados del ensayo de citometría para el análisis de transferencia de células Th. Para diferenciar las células del RD de las células del RR, se tiñeron células mononucleares de bazo del RD con CFSE previo a la inoculación i.p o i.v. (según fuera el caso). Para corroborar la obtención de células CD4⁺ de bazo y GLM de los RR, las células fueron

teñidas con el mAb anti-CD4-FITC. **a.** Muestras celulares control utilizadas para el ensayo de citometría. Los dos paneles izquierdos muestran células de bazo del RD (primer panel, células sin teñir (S/T); segundo panel, células teñidas con CFSE) y los dos paneles derechos muestran células de un RR teñidas con un mAb anti-CD4-FITC (tercer panel, células de bazo; cuarto panel, células de GLM). **b.** Muestras celulares de RR. Los dos paneles izquierdos muestran células CFSE⁺ del ratón inoculado por vía i.p (primer panel, células de bazo; segundo panel, células de GLM) y los dos paneles derechos muestran células CFSE⁺ del ratón inoculado por vía i.v. (tercer panel, células de bazo; cuarto panel, células de GLM). Se utilizó el software FlowJo para analizar las lecturas de la prueba y generar los gráficos presentados.

10. DISCUSIÓN

La erradicación de las enfermedades infecciosas no es el único objetivo de la investigación en el área de la inmunología. Conforme ha ido evolucionando la investigación, el descubrimiento científico ha permitido mejorar el desarrollo de la tecnología biomédica, brindando así una comprensión más clara de los sistemas que componen el cuerpo humano y la interrelación entre estos, como es el caso del estudio de la respuesta inmune a nivel de la mucosa intestinal y su relación con la respuesta que se da en el resto de los tejidos linfoides asociados a la mucosa. Incluso también en la relación que puede tener o no con la respuesta inmune producida contra algún agente extraño a nivel sistémico.

La proteína VP6 de RV, se ha propuesto como candidato para el desarrollo de una vacuna de nueva generación contra la infección por RV. Esta proteína es la más conservada entre las diferentes cepas virales con una identidad global que va del 87 al 99% y es altamente inmunogénica (Esquivel, Lopez, Guitierrez-X, & Arias, 2000b; Ward & McNeal, 2010). Debido a dicho potencial, la búsqueda de epítomos protectores dentro de la proteína (Baños et al., 1997; Choi et al., 2000, 2003; Newell et al., 2013) ha sido una estrategia que se ha implementado para permitirnos estudiar los mecanismos efectores inmunitarios que inducen una respuesta contra la infección que causa RV en el intestino. De esta manera, en este trabajo, usando un modelo de vacunación i.n. con el péptido sintético VP6₂₈₉₋₃₀₂ (en presencia de TC como adyuvante), el cual es un epítipo de células Th reconocido en el contexto de la molécula del MHC clase II de ratón IE^d, se planteó analizar el papel de las células Th en la protección inducida contra la infección por RV a nivel de la mucosa intestinal.

La estrategia que se eligió para determinar el papel de las células Th en la protección inducida contra la infección por RV por el péptido sintético VP6₂₈₉₋₃₀₂, fue la eliminación *in vivo* de las células Th usando el anticuerpo monoclonal GK 1.5 específico para la molécula CD4 de ratón presente en todas las células Th. Se ha reportado que la inoculación de cantidades altas de este anticuerpo elimina más del

90% de esta población celular, muy probablemente a través del sistema de complemento (Jung, Suprunenko, Ashhurst, King, & Hofer, 2018). De esta manera, en experimentos piloto se encontró que 3 dosis de 1, 2.5 o 5 mg de ascites del hibridoma GK 1.5 inoculados i.p. podían eliminar más del 90% de las células CD4⁺ presentes en el bazo de los ratones. Esta eliminación no fue tan eficiente en el compartimiento intraepitelial del intestino delgado, ya que la inoculación de 2.5 mg de ascites eliminó de 58 a un 98% de las células CD4⁺ en los LIE. Esto se puede deber a que probablemente el anticuerpo no puede llegar tan fácilmente a la mucosa intestinal comparativamente a lo que ocurre para un órgano periférico como el bazo.

Cuando las células T CD4⁺ fueron eliminadas de los ratones vacunados y retados con el RV murino EDIM, la protección inducida por la vacunación se redujo significativamente, sin embargo, esta eliminación de la protección fue variable entre los 4 experimentos independientes que se realizaron. El hecho que no se haya obtenido el 100% de eliminación de la protección en todos los experimentos pudo deberse a una ineficaz eliminación de las células CD4⁺ en el compartimiento epitelial intestinal donde se lleva a cabo la función efectora contra la infección por RV, como se mostró en los experimentos piloto.

La función efectora directa por parte de las células Th ha sido reportada previamente en modelos de infección por el virus influenza. En nuestro modelo, esto podría llevarse a cabo a través de la secreción, por parte de las células Th, de citocinas citotóxicas como TNF α o linfoxina (Alejo et al., 2018; Koroleva, Fu, & Tumanov, 2018), o inclusive por citotoxicidad directa mediada por perforina sobre las células epiteliales intestinales que expresen moléculas de clase II en su superficie inducida tanto por IFNs tipo III como por IFN γ producidos en respuesta a la infección (Marshall et al., 2017; Teijaro, Verhoeven, Page, Turner, & Farber, 2010).

Otra posibilidad es que, aunque el péptido sintético es un epítipo de células Th, las células Tc (CD8⁺) y/o los anticuerpos también participen en la protección. En el caso de las células Tc, se ha demostrado que juegan un papel importante en la

eliminación de la infección por rotavirus (Laban et al., 2022; Rott et al., 1997). De esta manera, es posible que las células Th de memoria específicas para el péptido sintético en el compartimiento epitelial intestinal potencien la respuesta de las células Tc naive contra la infección y coadyuven a la protección. Sin embargo, para poder determinar si esto es el caso, sería necesario realizar ensayos de eliminación de células CD8⁺ *in vivo* en los ratones vacunados y retados con el virus, de manera similar a lo que se realizó en este estudio con las células Th.

La participación de los anticuerpos en la protección inducida por el péptido sintético es improbable ya que el péptido inoculado i.n. no indujo ni anticuerpos séricos ni anticuerpos intestinales IgA anti-RV previo al reto con el virus. En este último caso los anticuerpos IgA intestinales se indujeron a partir del día 5 de la infección de manera similar a lo mostrado en ratones infectados, pero no vacunados previamente. Esto claramente indica que el péptido sintético no es reconocido por las células B, o si es reconocido, este actúa como un hapteno que es antigénico, pero no inmunogénico, ya que no es una estructura oligomérica que pueda entrecruzar eficientemente el BCR.

Si bien existen varios estudios en los que se reportan respuestas de células B específicas del RV tanto intestinales como sistémicas (Angel et al., 2007; Franco et al., 2006), otros estudios han demostrado que la IgA fecal o la IgA sistémica no son esenciales para la protección contra la infección por RV (Kuklin et al., 2001) e incluso se ha reportado que individuos deficientes en IgA, logran contener la enfermedad contra el RV (Istrate, Hinkula, Hammarström, & Svensson, 2008), lo que refuerza nuestra conclusión de que los anticuerpos IgA no son esenciales para la protección contra la infección inducida por el péptido sintético en nuestro modelo de estudio.

Los resultados obtenidos de estos experimentos concuerdan con lo reportado en un modelo donde la proteína VP6 es inoculada i.n. en presencia de adyuvante, en donde dicha inmunización confirió una protección de más del 90% contra la

infección (Choi et al., 2002) y fue totalmente dependiente de células Th (Choi et al., 2002; McNeal et al., 2006). De manera similar Ward et al., 2010, inocularon i.n. la proteína VP6 expresada como una quimera con la proteína de unión a maltosa (MBP::VP6) en ratones y concluyeron que las células T CD4⁺ son los únicos linfocitos necesarios para la protección.

Una manera de corroborar el papel de las células Th en la protección inducida contra la infección por RV en nuestro modelo, era transferir las células Th de memoria específicas contra el péptido sintético a ratones singénicos naïve y retarlos con RV, para determinar si las células Th de memoria podrían transferir la protección. Para esto, se realizaron dos experimentos piloto de transferencia, donde células mononucleadas totales de bazo de ratones inmunizados con el péptido y retados con RV fueron transferidas i.p. a ratones naïve que posteriormente se retaron con RV. La intención de estos experimentos fue “asegurar” la transferencia de protección, ya que teóricamente las células de bazo contendrían células Th de memoria inducidas por la vacunación y células B y Tc de memoria inducidas por la infección por RV, y de esta manera establecer las condiciones de transferencia para experimentos posteriores con células Th de memoria específicas para el péptido.

Sin embargo, dos experimentos mostraron que la transferencia que las células de bazo de ratones vacunados y retados con RV no confieren protección alguna contra la infección en ratones naïve. Para determinar si las células de bazo se distribuían a nivel sistémico y de la mucosa intestinal, las células fueron marcadas con CFSE, transferidas i.p. y 48 hrs después se obtuvieron las células de bazo y de GLM y se analizaron por citometría de flujo. En el análisis no se encontraron células transferidas marcadas con CFSE ni en bazo ni en GLM. La inoculación i.p. de las células posiblemente impedía que las células migraran adecuadamente a los órganos linfoides examinados, por lo que se realizó una transferencia bajo las mismas condiciones, pero por la vía i.v., obteniéndose resultados similares. Esto sugiere que las células transferidas pudieron haber muerto por apoptosis o estar retenidas en algún órgano linfoide no analizado. Sin embargo, no se puede

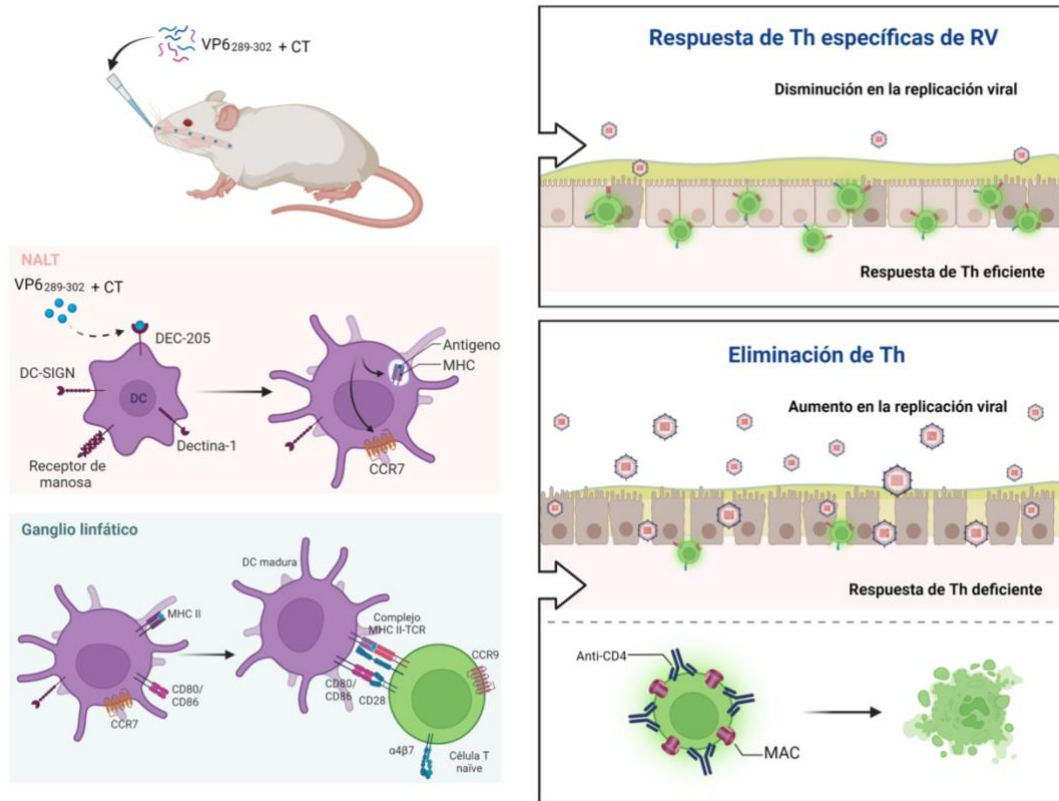
descartar un problema metodológico. En estudios futuros, es necesario dilucidar si se requiere modificar el método usado para la obtención y transferencia de las células, antes de purificar y transferir las células Th de memoria generadas por la vacunación con el péptido.

Finalmente, con base en los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que la vacunación i.n. del péptido sintético VP6₂₈₉₋₃₀₂ en presencia de un potente adyuvante de mucosas como la CT, induce células Th de memoria que son capaces de migrar al epitelio intestinal y participar en la protección contra una infección por RV. Las moléculas de direccionalidad $\alpha 4\beta 7^+$ y CCR9, juegan un papel importante en la migración de los linfocitos a la mucosa intestinal, por lo que es posible que estas moléculas sean inducidas en las células Th péptido específicas estimuladas en el NALT, ya que estudios previos han demostrado que estas moléculas pueden ser inducidas en esta mucosa (Ciabattini et al., 2011). Sin embargo, no se puede descartar que el péptido y el adyuvante puedan viajar sistémicamente y estimular a las células Th en el GLM o en la LP intestinal. Estudios futuros son necesarios para determinar con precisión los mecanismos involucrados en la protección mediada por las células Th en este modelo.

11. CONCLUSIÓN

Las células Th de memoria inducidas por una vacunación i.n. con el péptido sintético VP6₂₈₉₋₃₀₂ en presencia de CT, son esenciales para una protección eficiente contra la infección por RV a nivel de la mucosa intestinal.

12. MODELO PROPUESTO



13. PERSPECTIVAS

- Purificar células Th $CD4^+\alpha 4\beta 7^+$ de memoria, de bazo y GLM previo a la transferencia celular en ratones naïve.
- Analizar el perfil de citocinas pro y anti-inflamatorias de las células Th intraepiteliales.
- Analizar el efecto de la eliminación de células T $CD8^+$ en respuesta a la infección por rotavirus.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, O., Calderón, M. N., Moreno, L. P., & Guerrero, C. A. (2009). *Un modelo del mecanismo de entrada de los rotavirus a la célula hospedera. Rev.Fac.Med* (Vol. 57).
- Alejo, A., Ruiz-Argüello, M. B., Pontejo, S. M., Fernández De Marco, M. D. M., Saraiva, M., Hernáez, B., & Alcamí, A. (2018). Chemokines cooperate with TNF to provide protective anti-viral immunity and to enhance inflammation. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04098-8>
- Angel, J., Franco, M. A., & Greenberg, H. B. (2007). Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature Reviews Microbiology*, 5(7), 529–539. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1692>
- Angel, J., Franco, M. A., & Greenberg, H. B. (2012). Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Current Opinion in Virology*, 2(4), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.05.003>
- Arias, C. F., Silva-Ayala, D., & López, S. (2015). Rotavirus Entry: a Deep Journey into the Cell with Several Exits. *Journal of Virology*, 89(2), 890–893. <https://doi.org/10.1128/jvi.01787-14>
- Avendaño, L., Ferrés, M., & Spencer, E. (2011). *Virología Clínica. Mediterraneo*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>
- Badillo-Godinez, O., Gutierrez-Xicotencatl, L., Plett-Torres, T., Pedroza-Saavedra, A., Gonzalez-Jaimes, A., Chihu-Ampan, L., ... Esquivel-Guadarrama, F. (2015). Targeting of rotavirus VP6 to DEC-205 induces protection against the infection in mice. *Vaccine*, 33(35), 4228–4237. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.080>
- Baños, D. M., Lopez, S., Arias, C. F., & Esquivel, F. R. (1997). Identification of a T-helper cell epitope on the rotavirus VP6 protein. *Journal of Virology*, 71(1), 419–426. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.1.419-426.1997>
- Berin, M. C., & Chehade, M. (2010). Mucosal Immunology. In *Pediatric Allergy: Principles and Practice* (Second Edi, pp. 471–476). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0271-2.00044-4>

- Blutt, S. E., Miller, A. D., Salmon, S. L., Metzger, D. W., & Conner, M. E. (2012). IgA is important for clearance and critical for protection from rotavirus infection. *Mucosal Immunology*, *5*(6), 712–719. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.51>
- Calistri, A., Reale, A., Palù, G., & Parolin, C. (2021). Why Cells and Viruses Cannot Survive without an ESCRT. *Cells*, *10*(3), 483. <https://doi.org/10.3390/cells10030483>
- Carballal, G., & Oubiña, J. R. (2014). *Virología médica* (4^o Ed.). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Choi, A. H. C., Basu, M., McNeal, M. M., Flint, J., VanCott, J. L., Clements, J. D., & Ward, R. L. (2000). Functional Mapping of Protective Domains and Epitopes in the Rotavirus VP6 Protein. *Journal of Virology*, *74*(24), 11574–11580. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.24.11574-11580.2000>
- Choi, A. H. C., McNeal, M. M., Basu, M., Bean, J. A., VanCott, J. L., Clements, J. D., & Ward, R. L. (2003). Functional mapping of protective epitopes within the rotavirus VP6 protein in mice belonging to different haplotypes. *Vaccine*, *21*(7–8), 761–767. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00595-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00595-9)
- Choi, A. H. C., McNeal, M. M., Flint, J. A., Basu, M., Lycke, N. Y., Clements, J. D., ... Ward, R. L. (2002). The level of protection against rotavirus shedding in mice following immunization with a chimeric VP6 protein is dependent on the route and the coadministered adjuvant. *Vaccine*, *20*(13–14), 1733–1740. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00043-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00043-9)
- Ciabattini, A., Pettini, E., Fiorino, F., Prota, G., Pozzi, G., & Medaglini, D. (2011). Distribution of Primed T Cells and Antigen-Loaded Antigen Presenting Cells Following Intranasal Immunization in Mice. *PLoS ONE*, *6*(4), e19346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019346>
- Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., ... Bernstein, D. I. (2018). Rotavirus infection HHS Public Access. *JAMA Pediatrics*, *172*(SUPPL. 3), 50–53. <https://doi.org/10.1038/hrdp.2017.83.Rotavirus>
- Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., ... Estes, M. K. (2017). Rotavirus infection. *Nature Reviews Disease*

- Primers, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>
- Dennehy, P. H. (2015). Rotavirus Infection: A Disease of the Past? *Infectious Disease Clinics of North America*, 29(4), 617–635. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.07.002>
- Desselberger, U. (2014, September 22). Rotaviruses. *Virus Research*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.016>
- Esquivel, F. R., Lopez, S., Guitierrez-X, L., & Arias, C. (2000a). The internal rotavirus protein VP6 primes for an enhanced neutralizing antibody response. *Archives of Virology*, 145(4), 813–825. <https://doi.org/10.1007/s007050050674>
- Esquivel, F. R., Lopez, S., Guitierrez-X, L., & Arias, C. (2000b). The internal rotavirus protein VP6 primes for an enhanced neutralizing antibody response. *Archives of Virology*, 145(4), 813–825. <https://doi.org/10.1007/s007050050674>
- Estes, M. K., & Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews*, 53(4), 410–449. <https://doi.org/10.1128/mr.53.4.410-449.1989>
- Felix-Valenzuela, L., Cooley-García, D. P., Cano-Rangel, M. A., Durazo-Arvizu, M. D. L. A., & Mata-Haro, V. (2017). Predominance of G9P[4] Rotavirus from Children with Acute Gastroenteritis in Northwestern Mexico. *Intervirology*, 59(4), 228–233. <https://doi.org/10.1159/000464132>
- Franco-Cortés, M. A. (2016). Papel del TGF- β en la inmunidad contra los rotavirus. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 40(154), 18. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.300>
- Franco, M. A., Angel, J., & Greenberg, H. B. (2006). Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine*, 24(15), 2718–2731. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.12.048>
- Gesualdo, L., Di Leo, V., & Coppo, R. (2021). The mucosal immune system and IgA nephropathy. *Seminars in Immunopathology*, 43(5), 657–668. <https://doi.org/10.1007/s00281-021-00871-y>
- Gómez-Rial, J., Rivero-Calle, I., Salas, A., & Martín-Torres, F. (2020). Rotavirus and autoimmunity. *Journal of Infection*, 81(2), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.041>

- Gutiérrez, Michelle, Isa, P., Sánchez-San Martín, C., Pérez-Vargas, J., Espinosa, R., ... López, S. (2010). Different Rotavirus Strains Enter MA104 Cells through Different Endocytic Pathways: the Role of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Journal of Virology*, *84*(18), 9161–9169. <https://doi.org/10.1128/jvi.00731-10>
- Guzman-Holst, A., Ortega-Barria, E., Flores, Á. A., Carreño-Manjarrez, R., Constenla, D., & Cervantes-Apolinar, M. Y. (2021). 15-year experience with rotavirus vaccination in Mexico: a systematic literature review. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *17*(10), 3623–3637. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1936859>
- Hagbom, M., De Faria, F. M., Winberg, M. E., Westerberg, S., Nordgren, J., Sharma, S., ... Svensson, L. (2020). Neurotrophic factors protect the intestinal barrier from rotavirus insult in mice. *MBio*, *11*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02834-19>
- Hagbom, M., Sharma, S., Lundgren, O., & Svensson, L. (2012). Towards a human rotavirus disease model. *Current Opinion in Virology*, *2*(4), 408–418. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.05.006>
- 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. *Journal of Virology*, *83*(10), 4942–4951. <https://doi.org/10.1128/jvi.01450-08>
- Istrate, C., Hinkula, J., Hammarström, L., & Svensson, L. (2008). Individuals with selective IgA deficiency resolve rotavirus disease and develop higher antibody titers (IgG, IgG1) than IgA competent individuals. *Journal of Medical Virology*, *80*(3), 531–535. <https://doi.org/10.1002/jmv.21101>
- João, E. D., Strydom, A., O'Neill, H. G., Cuamba, A., Cassocera, M., Acácio, S., ... de Deus, N. (2018). Rotavirus A strains obtained from children with acute gastroenteritis in Mozambique, 2012-2013: G and P genotypes and phylogenetic analysis of VP7 and partial VP4 genes. *Archives of Virology*, *163*(1), 153–165. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3575-y>
- Jung, S. R., Suprunenko, T., Ashhurst, T. M., King, N. J. C., & Hofer, M. J. (2018). Collateral Damage: What Effect Does Anti-CD4 and Anti-CD8α Antibody–

- Mediated Depletion Have on Leukocyte Populations? *The Journal of Immunology*, 201(7), 2176–2186. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800339>
- Koroleva, E. P., Fu, Y.-X., & Tumanov, A. V. (2018). Lymphotoxin in physiology of lymphoid tissues – Implication for antiviral defense. *Cytokine*, 101(23), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.018>
- Kuklin, N. A., Rott, L., Feng, N., Conner, M. E., Wagner, N., Müller, W., & Greenberg, H. B. (2001). Protective Intestinal Anti-Rotavirus B Cell Immunity Is Dependent on $\alpha 4 \beta 7$ Integrin Expression But Does Not Require IgA Antibody Production . *The Journal of Immunology*, 166(3), 1894–1902. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.3.1894>
- Laban, N. M., Goodier, M. R., Bosomprah, S., Simuyandi, M., Chisenga, C., Chilyabanyama, O. N., & Chilengi, R. (2022). T-Cell Responses after Rotavirus Infection or Vaccination in Children: A Systematic Review. *Viruses*, 14(3), 459. <https://doi.org/10.3390/v14030459>
- Labastida-Conde, R. G., Ramírez-Pliego, O., Peleteiro-Olmedo, M., Lopez-Guerrero, D. V., Badillo-Godinez, O. D., Gutiérrez-Xicoténcatl, M. de L., ... Santana, M. A. (2018). Flagellin is a Th1 polarizing factor for human CD4+ T cells and induces protection in a murine neonatal vaccination model of rotavirus infection. *Vaccine*, 36(29), 4188–4197. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.06.005>
- Lappalainen, S., Pastor, A. R., Malm, M., López-Guerrero, V., Esquivel-Guadarrama, F., Palomares, L. A., ... Blazevic, V. (2015). Protection against live rotavirus challenge in mice induced by parenteral and mucosal delivery of VP6 subunit rotavirus vaccine. *Archives of Virology*, 160(8), 2075–2078. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2461-8>
- Lee, B., & Colgate, E. R. (2019). Rotavirus Epidemiology and Vaccine Effectiveness: Continuing Successes and Ongoing Challenges. *Pediatrics*, 144(4), e20192426. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-2426>
- Lestari, F. B., Vongpunsawad, S., Wanlapakorn, N., & Poovorawan, Y. (2020). Rotavirus infection in children in Southeast Asia 2008-2018: Disease burden, genotype distribution, seasonality, and vaccination. *Journal of Biomedical*

- Science*, 27(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00649-8>
- Lopez-Guerrero, D. V., Arias, N., Gutierrez-Xicotencatl, L., Chihu-Ampanan, L., González, A., Pedroza-Saavedra, A., ... Esquivel-Guadarrama, F. (2018). Enhancement of VP6 immunogenicity and protective efficacy against rotavirus by VP2 in a genetic immunization. *Vaccine*, 36(22), 3072–3078. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.104>
- Lopez, S., & Arias, C. F. (2006). Early Steps in Rotavirus Cell Entry. In *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis* (Vol. 309, pp. 39–66). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-30773-7_2
- López, S., & Arias, C. F. (2020). Rotavirus genomics. Public health impact. *Salud Publica de Mexico*, 62(1), 36–41. <https://doi.org/10.21149/9965>
- Lucero, Y. (2014). Etiología y manejo de la gastroenteritis aguda infecciosa en niños y adultos. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 463–472. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70063-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70063-X)
- Marshall, N. B., Vong, A. M., Devarajan, P., Brauner, M. D., Kuang, Y., Nayar, R., ... Swain, S. L. (2017). NKG2C/E Marks the Unique Cytotoxic CD4 T Cell Subset, ThCTL, Generated by Influenza Infection. *The Journal of Immunology*, 198(3), 1142–1155. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601297>
- Martinez-Laso, J., Román, A., Head, J., Cervera, I., Rodríguez, M., Rodríguez-Avial, I., & Picazo, J. J. (2009). Phylogeny of G9 rotavirus genotype: A possible explanation of its origin and evolution. *Journal of Clinical Virology*, 44(1), 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.08.022>
- McDonald, B. D., Jabri, B., & Bendelac, A. (2018). Diverse developmental pathways of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, 18(8), 514–525. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0013-7>
- McNeal, M. M., Stone, S. C., Basu, M., Bean, J. A., Clements, J. D., Hendrickson, B. A., ... Ward, R. L. (2006). Protection against rotavirus shedding after intranasal immunization of mice with a chimeric VP6 protein does not require intestinal IgA. *Virology*, 346(2), 338–347. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.016>
- Mousavi-Nasab, S. D., Sabahi, F., Kaghazian, H., Paryan, M., Mirab Samiee, S.,

- Ghaderi, M., ... Makvandi, M. (2020). A Real-Time RT-PCR Assay for Genotyping of Rotavirus. *Iranian Biomedical Journal*, 24(6), 399–404. <https://doi.org/10.29252/ibj.24.6.394>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2009). *Sexta edición. S.A. Elsevier España* (Vol. Sexta Edic).
- Nagler-Anderson, C. (2001). Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nature Reviews Immunology*, 1(1), 59–67.
- NCBI. (2016). Gene @ Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3265>
- Newell, E. W., Sigal, N., Nair, N., Kidd, B. A., Greenberg, H. B., & Davis, M. M. (2013). Combinatorial tetramer staining and mass cytometry analysis facilitate T-cell epitope mapping and characterization. *Nature Biotechnology*, 31(7), 623–629. <https://doi.org/10.1038/nbt.2593>
- Ohno, H. (2015). Intestinal M cells. *Journal of Biochemistry*, 159(2), 151–160. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv121>
- Olaiz-Fernández, G. A., Gómez-Peña, E. G., Juárez-Flores, A., Vicuña-de Anda, F. J., Morales-Ríos, J. E., & Carrasco, O. F. (2020). Panorama historico de la enfermedad diarreica aguda en Mexico y el futuro de su prevencion. *Salud Publica de Mexico*, 62(1), 25–35. <https://doi.org/10.21149/10002>
- Parashar, U. D., Bresee, J. S., Gentsch, J. R., & Glass, R. I. (1998). Rotavirus. *Emerging Infectious Diseases*, 4, 561–570.
- Pastor, A. R., Rodríguez-Limas, W. A., Contreras, M. A., Esquivel, E., Esquivel-Guadarrama, F., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2014). The assembly conformation of rotavirus VP6 determines its protective efficacy against rotavirus challenge in mice. *Vaccine*, 32(24), 2874–2877. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.018>
- Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., & Owen, J. A. (2020). *KUBY. Inmunología*. (J. De León, Ed.) (Octava edi). McGraw-Hill. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.14364>
- Raju, B., Parikh, R. P., Vetter, V. V., & Kolhapure, S. (2019). Epidemiology of

- rotavirus gastroenteritis and need of high rotavirus vaccine coverage with early completion of vaccination schedule for protection against rotavirus diarrhea in India: A narrative review. *Indian Journal of Public Health*, 63(3), 243–250. https://doi.org/10.4103/ijph.IJPH_307_18
- Ramiro-Puig, E., Pérez-Cano, F. J., Castellote, C., Franch, A., & Castell, M. (2008). El intestino: Pieza clave del sistema inmunitario. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100(1), 29–34. <https://doi.org/10.4321/s1130-01082008000100006>
- RCWG. (2020). Virus Classification – Laboratory of Viral Metagenomics. Retrieved November 27, 2020, from <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification>
- Resch, T. K., Wang, Y., Moon, S. S., Joyce, J., Li, S., Prausnitz, M., & Jiang, B. (2018). Inactivated rotavirus vaccine by parenteral administration induces mucosal immunity in mice. *Scientific Reports*, 8(561), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18973-9>
- Richardson-López Collada, V., Bautista-Márquez, A., Sánchez-Urbe, E., & Esparza-Aguilar, M. (2020). Impacto poblacional a 10 años de la vacunación contra rotavirus en México. *Salud Pública de México*, 61, 6–13. <https://doi.org/10.21149/9936>
- Rott, L. S., Rosé, J. R., Bass, D., Williams, M. B., Greenberg, H. B., & Butcher, E. C. (1997). Expression of mucosal homing receptor $\alpha 4\beta 7$ by circulating CD4+ cells with memory for intestinal rotavirus. *Journal of Clinical Investigation*, 100(5), 1204–1208. <https://doi.org/10.1172/JCI119633>
- Sánchez Ramón, S., Manzanares, M., & Candelas, G. (2020). Vacunas antiinfecciosas de mucosas en la profilaxis de infecciones recurrentes: más allá de las vacunas convencionales. *Reumatología Clínica*, 16(1), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2018.10.012>
- Silva-Ayala, D., López, T., Gutiérrez, M., Perrimon, N., López, S., Arias, C. F., & Estes, M. K. (2013). Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(25), 10270–10275.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1304932110>

- Skansberg, A., Sauer, M., Tan, M., Santosham, M., & Jennings, M. C. (2021). Product review of the rotavirus vaccines ROTASIIL, ROTAVAC, and Rotavin-M1. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 17(4), 1223–1234. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1804245>
- Smiley, K. L., McNeal, M. M., Basu, M., Choi, A. H.-C., Clements, J. D., & Ward, R. L. (2007). Association of Gamma Interferon and Interleukin-17 Production in Intestinal CD4+ T Cells with Protection against Rotavirus Shedding in Mice Intranasally Immunized with VP6 and the Adjuvant LT(R192G). *Journal of Virology*, 81(8), 3740–3748. <https://doi.org/10.1128/jvi.01877-06>
- Suzuki, H. (2019, August 1). Rotavirus replication: Gaps of knowledge on virus entry and morphogenesis. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. Tohoku University Medical Press. <https://doi.org/10.1620/tjem.248.285>
- Takaki, H., Ichimiya, S., Matsumoto, M., & Seya, T. (2018). Mucosal Immune Response in Nasal-Associated Lymphoid Tissue upon Intranasal Administration by Adjuvants. *Journal of Innate Immunity*, 10(5–6), 515–521. <https://doi.org/10.1159/000489405>
- Tamminen, K., Lappalainen, S., Huhti, L., Vesikari, T., & Blazevic, V. (2013). Trivalent Combination Vaccine Induces Broad Heterologous Immune Responses to Norovirus and Rotavirus in Mice. *PLoS ONE*, 8(7), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070409>
- Teijaro, J. R., Verhoeven, D., Page, C. A., Turner, D., & Farber, D. L. (2010). Memory CD4 T Cells Direct Protective Responses to Influenza Virus in the Lungs through Helper-Independent Mechanisms. *Journal of Virology*, 84(18), 9217–9226. <https://doi.org/10.1128/JVI.01069-10>
- Troeger, C., Blacker, B. F., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, S., Zimsen, S. R., ... Reiner, R. C. (2018). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(11), 1211–1228. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30362-1)
- Varghese, T., Kang, G., & Steele, A. D. (2022). Understanding Rotavirus Vaccine

- Efficacy and Effectiveness in Countries with High Child Mortality. *Vaccines*, 10(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/vaccines10030346>
- Ward, R. L., & McNeal, M. M. (2010). VP6: A candidate rotavirus vaccine. *Journal of Infectious Diseases*, 202(SUPPL. 1), 101–107. <https://doi.org/10.1086/653556>
- Wiendl, M., Becker, E., Müller, T. M., Voskens, C. J., Neurath, M. F., & Zundler, S. (2021). Targeting Immune Cell Trafficking – Insights From Research Models and Implications for Future IBD Therapy. *Frontiers in Immunology*, 12(May), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.656452>
- World Health Organisation. (2014). *Weekly epidemiological record. PLoS neglected tropical diseases* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000762>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 03 de noviembre de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Análisis de la respuesta de células Th en un modelo murino de vacunación intranasal contra rotavirus**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Yael Hernández Guadarrama. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 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:2022-11-03 23:32:33 | Firmante

InEn/yFhhcDSuVNlwa8e5TzbpeidwL8LrrNjRj9ju7G4naUiafJzcnCQLaSHJ9B35UR6N/PtrpXUApDBKIPmlRKnWTXgUsAg6ljnM37u0o/pWLuQb90Rg6t2wZsVttrwQ3i7Tte/BkH7G70V9f2jMglH2ixxfz++s3CFsTQqvDS7Y/Xa8UQ0OJxHokDbsY1W53kAai6y6UWkvXR6trCSxY7f5iFCGmXG3iZnJbJi6+i1d2i+G4PR3yhLVnK9CejsSiNDMutRqduHSaBlbZooqPsYUULzTTObAGS9poZAgPiO1yy9ubhjPyGBcaKUo26fCi3hjF6QaVBoFsY2PcttQ==

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



[Yw0g3IHmQ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/oLiWDD6wOMcrHCMvUSAEygG2ttHdUsoV>



Cuernavaca, Mor., 03 de noviembre de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Análisis de la respuesta de células Th en un modelo murino de vacunación intranasal contra rotavirus**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Yael Hernández Guadarrama. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 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. 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:2022-11-07 15:44:43 | Firmante

Qw9GKbJD64a4FOmlkyVoEVluFWkNVa+Z4+vvIQw4+3M+02nUyyVFi+WxKNUe6XFf12eLTv/zDuKS0W9AUMUEc09m7rk1llm2A7QozcuZvLsgvovdNq2h+T1eXG0/Qi7RndruxNgB82uJXmp6rbgtxR/ljnNgxFvz58MubhM64wqIOf+/ePUin2LMUI5cql3h5P7dq4sGvcnB3Zwd9dv3zIFDS+4+K6po7M72uoPEDsjjynwUonb5OWTNBaZmXBMuScTxkAeGFsVxbtE6uhMOj9eKg1qOhYoMOoGBGE8wvNoXtK8oA2/YCWAYES2wUh8mykR9zBylZvWia8+HYz0o5g==

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



[2GJwYiyIF](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/pllxUbrdmFyllOIC19rVJ5NusqvBRGi0>



Cuernavaca, Mor., 03 de noviembre de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Análisis de la respuesta de células Th en un modelo murino de vacunación intranasal contra rotavirus**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Yael Hernández Guadarrama. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 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. Gabriela Rosas Salgado



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

GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2022-11-07 13:48:09 | Firmante

nWNgh9uY0LejFyDAFSuir7Ssfs/mq4CXkPmFJ3lffhAi1skCp8BJ2zB6PSjJlU/153LvkgoyRkXQtTADs1zc7EY/3qmP+wbxFRXM11DcWZ2xgqJvHg42Yiir76Nq6nEARXQjy54KVTL5f/DNjn7QfwwDsAJkc4lv6mxQUvILrZ6b5Xe5KFyU8+4Bl7p8hHZGEPcuVRZkS+Is4yvDfC2DS8IK2en0tXTZgbCRh4ynh4xHez7FJhPfpDjETUu0w6glLWQsb0vAjD1Y3q6MEGR4WtV6NMqs8KU31XZS3rSeZmBJDf6Goz3c9uleUPnLzqTP7PRQ/BNFZle94cQ/NwNKDMg==

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



[DqX9a4ci6](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ukev2noqyzKpHXmboP1xR1PwGbEFbQ4>



Cuernavaca, Mor., 03 de noviembre de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Análisis de la respuesta de células Th en un modelo murino de vacunación intranasal contra rotavirus**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Yael Hernández Guadarrama. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 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

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:2022-11-03 16:06:09 | Firmante

ZK5fJB7X6WM0+jjll6kQQyj0VnolgzHJdvjnXp2BKeUtmCBwMlud6k2FHONDBeAxNndXjz8bgXOb7uHilJcxcfvUL9VO94RUW4UCYV5XzMdMYmwcnduE9vGeMWUcA6JqoYgA
FO/j7q04fdsqUbH0ypd/6cL1ws9B2r/E5tK+USyalDz/NM1cqedAcUWA+91M5D06OnytsbM41dQuPuocACIva4Cgxntx23l+Q1fF+2/Hc06Efo+IIEbzvLGgR6fp+TWryP7a/ADEvoguX
aK9ynbHpsrPKYI7TsHbaD115Sp99KrvEG5RMZuo0ZUSSFP6kELu9hmyxs1yZiObiaLdg==

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



42R1gn8U7

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/LB6a3bJMHXwovijCmmdVVmU0c2ZrwPjy>

