

00551



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MÉXICO**



**INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGÍA**



**“Análisis del perfil de citocinas inducido en placas de
peyer y ganglio linfático mesentérico en la infección
por rotavirus en un modelo de ratón”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
BIOQUIMICAS
P R E S E N T A**

Q. IRIS CRISTINA LÓPEZ SANTILLÁN

Tutor:

Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama.

CUERNAVACA, MORELOS

2005

m. 339793



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Lis Pastina López Santillan

FECHA: 7 de Enero de 2005

FIRMA: 

El presente trabajo fue realizado en las siguientes instituciones.

- *Departamento de Genética y Fisiología Molecular.
Instituto de Biotecnología.
Universidad Nacional Autónoma de México.*
- *Departamento de Virus y Cáncer.
Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas.
Instituto Nacional de Salud Pública.*
- *Facultad de Medicina.
Universidad Autónoma del Estado de Morelos.*

Comité Tutorial:

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay.
Dr. Vianey Ortíz Navarrete.
Dr. Carlos Federico Arias Ortiz

Miembros del Jurado:

Presidente: Dr. Jean Louis Charli Casalonga.
Secretario: Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama.
Vocal: Dr. Celso Ramos García.
Suplente: Dr. Luis Padilla Noriega.
Suplente: Dra. María Angélica Santana Calderón.

Agradecimientos:

- A Dios. Por todo. Por darme otra oportunidad de vivir.
- A mis padres. Por darme la vida, por enseñarnos a ser mejores, a no desfallecer, a terminar lo inconcluso y saber que no estamos solas. Por su mano amiga en todo momento.
- A David. Por ser siempre mi pequeño, mi razón de vivir y de luchar.
- A mis hermanitas: Ana Elisa, Dora Enriqueta, Mónica Judith y Alba Cecilia. Por que entre nuestros juegos y las peleas aprendí a amarlas, a perdonarlas, a entenderlas y sobre todo a darles mi apoyo en todo momento y circunstancia.
- A Miguel. Por darme lo más hermoso que tengo en la vida, y por los buenos momentos.
- A el Dr. Fernando Esquivel. Por sus consejos como tutor y como amigo.
- A la Dra. Lourdes Gutierrez. Por su apoyo incondicional, sus consejos y sus platicas amenas.
- A la Dra. Susana López y el Dr. Carlos Arias. Por el apoyo otorgado.
- Al Comité Tutorial, y a los miembros del Jurado, por sus acertados comentarios y consejos.
- A mis amigas y compañeras de clase del IBT. Miranda, Celia, Isadora, Sonia, Marina, Paty y Gaby. Por que siempre había un buen chisme o un buen articulo para la clase que discutir.
- A mi compañero Paul. Por su apoyo técnico y por las agradables charlas y chismes en los pasillos.
- A Roselia A. Rosales, por todos los buenos momentos que pasamos juntas, por cada risa y por cada lágrima que derramamos juntas, por su amistad.
- A mis compañeros de clase, por los momentos agradables que pasamos juntos. Isabel, Mario, Carlos, Rayito, Norma.
- Al personal de docencia del IBT, por su trato amable.

- A mis compañeros de laboratorio en el IBT. Jimena, Selene, Ginna, Pedrito Jr., Miguel Ángel, Sr. Pedro Romero, Rafa, Mariela, y los Dres. Ernesto y Pavel.
- A mis compañeros de laboratorio en el INSP. SSA. Tanya y Mine (por ser unas excelentes comadres), Fito (por sus enseñanzas), Humberto (por ayudarme con el RNA), Rocío. Y también a la gente del INSP que siempre me apoyó. Karla, Claudia, Oscar, Lilia y Jesús.
- A mis compañeros estudiosos de la inmunología de rotavirus. Ernesto (por ser un gran cuate todos estos años y por aguantarme), Nancy y Anita (por tener siempre un buen chisme entre cada ELISA), Vanesa, Tanya y Denisse (por aceptarme tan bien nuevamente en el grupo). Y a Oscar.
- A las personas que han estado a mi lado durante los dos años de la maestría y que conocí en el INSP, en el IBT y en la UAEM.

Resumen

Los rotavirus son los principales agentes etiológicos de gastroenteritis virales en humanos y varias especies animales. Son la causa más frecuente de diarrea aguda en infantes que puede conducir a deshidratación grave y de no ser atendida a tiempo, puede causar la muerte. Por esta razón, a nivel internacional, el desarrollo de vacunas es de gran importancia. Durante la infección por rotavirus en el ratón se ha observado que la aparición de la respuesta inmune intestinal de anticuerpos (Ab) tipo IgA antirotavirus correlaciona con la limpieza de la infección primaria, así como con la protección a la reinfección viral. De igual manera se ha observado que la inducción de células T citotóxicas (Tc) CD8⁺ es importante en la resolución de la infección primaria. Se ha pensado que la respuesta inmune de citocinas en la infección por rotavirus juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune humoral y celular. Se han descrito tres principales subgrupos de la respuesta inmune de citocinas. La respuesta tipo T cooperadora (Th)-1 se caracteriza principalmente por la secreción de IL-12, INF- γ e IL-2, eficientes inductores de linfocitos Tc y de la síntesis de IgG2a, mientras que la respuesta tipo Th2, se caracteriza por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-10, promoviendo la respuesta de células B, que incluye la producción de anticuerpos del tipo IgA, IgG1 e IgE. La respuesta tipo Th3 se caracteriza por la secreción de TGF- β , la producción de anticuerpos IgA y la regulación/supresión de las respuestas tipo Th1 y Th2. En este trabajo nos propusimos analizar la inducción de la respuesta de citocinas en la infección primaria por rotavirus en la placa de Peyer (PP) y ganglio linfático mesentérico (GLM) del ratón adulto y correlacionar esta respuesta con la producción de anticuerpos secretados en heces, a nivel sistémico, y local en diferentes órganos linfoides. Para esto, ratones adultos BALB/c fueron infectados oralmente con rotavirus murino EDIM silvestre, y a lo largo de la infección se aislaron células de PP y GLM, de donde se extrajo el RNA total y mediante reacciones de RT-PCR se amplificaron los mensajes para β -actina, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p40, INF- γ y TGF- β . Se encontró que en PP y GLM se inducen los mensajes para IL-2, IL-10, IL-12p40, INF- γ y TGF- β , con diferentes cinéticas para cada órgano. En PP la inducción se dió principalmente durante la fase temprana de la infección y en GLM fue en la última etapa de la misma. De esta manera es evidente que en respuesta a la infección por rotavirus, tanto en PP como en GLM, hay patrón mixto y no prolongado de la respuesta inmune de citocinas, con diferentes cinéticas en ambos órganos y que correlaciona con la producción de anticuerpos IgG2a e IgG1 a nivel sistémico, así como con la presencia de células productoras de anticuerpos IgG e IgA en PP y GLM.

Actualmente a nivel mundial, es de especial interés el desarrollo de nuevas vacunas para rotavirus que monten una adecuada respuesta inmunoprotectora, por lo que el conocimiento básico de los mecanismos mediante los cuales se monta la respuesta inmune para rotavirus, provee de las herramientas necesarias para llevar acabo este objetivo. Así mismo, los eventos que ocurren en los sitios de inducción de la respuesta inmune de mucosas, están siendo ampliamente estudiados debido a que el tipo de respuesta que se induce en estos sitios tiene características especiales, que difieren de aquellas observadas a nivel sistémico. Así, el ambiente de citocinas en el que se desarrolla, la respuesta celular y humoral durante la infección primaria por rotavirus en los tejidos linfoides asociados a mucosa intestinal, y a través del cual esta respuesta se modula, no había sido descrito, por lo que este estudio contribuye de manera importante al conocimiento básico de la respuesta inmune de la mucosa intestinal.

INDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Epidemiología de la infección por rotavirus.....	1
1.2. Estructura.....	2
a) Antecedentes.....	2
b) Genoma viral.....	2
c) Estructura viral.....	3
d) Clasificación.....	4
e) Ciclo replicativo.....	5
f) Patología.....	6
1.3. Generalidades de la respuesta inmune.....	7
a) Respuesta inmune innata.....	7
b) Respuesta de células B.....	7
c) Respuesta de células T.....	8
i. El MHC I y la activación de los linfocitos Tc.....	9
ii. El MHC II y la activación de las células Th.....	10
d) Citocinas.....	11
e) Respuesta inmune tipo Th0, Th1, Th2, Th3 y T _R	12
i. Th0.....	12
ii. Th1.....	12
iii. Th2.....	13
iv. Th3.....	13
v. Las células T regulatorias (T _R).....	14
f) Respuesta inmune de la mucosa intestinal.....	14
1.4. Respuesta inmune en la infección por rotavirus.....	16
a) Modelo de infección por rotavirus en el ratón adulto.....	16
b) Respuesta innata.....	16
c) La respuesta de las células B en la infección por rotavirus.....	17
d) La respuesta inmune de las células T CD8+ (Tc) en la infección por rotavirus.....	18
e) La respuesta inmune de las células Th en la infección por rotavirus.....	18
f) Citocinas en la infección por rotavirus.....	19
2. Justificación.....	21
3. Hipótesis.....	21
4. Objetivos.....	22
5. Metodología.....	23
5.1. Medios de cultivo.....	23
5.2. Líneas celulares.....	23
5.3. Cepas virales.....	23
a) Expansión viral.....	24
b) Semipurificación viral por colchón de sacarosa.....	24
c) Determinación de proteínas por el método de Lowry.....	24
d) Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	24
5.4. Ratones e infección.....	25

5.5. Extracción de células de órganos.....	25
a) Estimulación de células de órganos con concanavalina-A.....	26
5.6. Extracción de RNA.....	26
5.7. Síntesis de primers.....	28
5.8. Transcripción-Reversa (RT).....	28
5.9. PCR (reacción en cadena de la polimerasa).....	29
a) Cuantificación de las bandas obtenidas de los ensayos de PCR.....	29
5.10. Detección de rotavirus y anticuerpos específicos contra rotavirus.....	29
a) Determinación de antígeno viral en heces.....	30
b) Determinación de anticuerpos tipo IgA rotavirus específicos.....	30
c) Detección de anticuerpos Ig's totales contra rotavirus en suero.....	31
5.11. Producción de anticuerpos rotavirus específicos <i>in vitro</i>	31
6. RESULTADOS.....	32
6.1. Montaje del modelo de infección por rotavirus en ratón adulto.....	32
a) Seguimiento del proceso infeccioso y su resolución.....	32
b) Presencia de anticuerpos IgA antirotavirus en heces.....	33
c) Presencia de anticuerpos antirotavirus en suero.....	34
6.2. Amplificación del mensaje para citocinas en placas de Peyer de ratones infectados con EDIM	35
6.3. Montaje de las condiciones experimentales para el aislamiento y amplificación del RNA.....	37
a) Determinación de la calidad del RNA extraído de las células linfoides.....	37
b) Determinación de la cantidad óptima de RNA necesaria en las reacciones de RT-PCR.....	38
6.4. Análisis de la respuesta inmune de las células aisladas de órganos linfoides asociados a mucosa intestinal de ratones infectados con EDIM.....	43
a) Número celular en PP y GLM en respuesta a la infección.....	43
6.5. Análisis del mensaje para citocinas de células aisladas de órganos linfoides asociados a mucosa intestinal de ratones infectados con EDIM.....	44
a) Análisis del mensaje para citocinas en células de placas de Peyer.....	45
b) Análisis del mensaje para citocinas en células de ganglios linfáticos mesentéricos.....	47
6.6. Perfil de anticuerpos IgG1 e IgG2a antirotavirus en suero.....	49
6.7. Producción <i>in vitro</i> de anticuerpos específicos a rotavirus del tipo IgA, IgG e IgM de células de órganos de ratones infectados por EDIM.....	50
6.8. Análisis del mensaje para citocinas de células mononucleadas aisladas de bazo de ratones infectados con Vaccinia.....	53
7. Discusión.....	55
8. Conclusiones.....	61
9. Perspectivas.....	61
10. Bibliografía.....	62

Abreviaturas

BCR	Receptor de células B
Con·A	Concanavalina·A
CPA	Célula presentadora de antígeno
CTL	Linfocito T citotóxico
EAF	Epitelio asociado a folículos
GLM	Ganglios linfáticos mesentéricos
HEV	Altas vénulas endoteliales
I	Cadena invariante
IFN- γ	Interferón gama
Ig	Inmunoglobulina
IL·	Interleucina
IL·XR	Receptor para interleucina
KO	Knock out
LP	Lámina propia
Mad·CAM	Molécula de adhesión celular· adressina mucosal
MHC I	Complejo principal de histocompatibilidad de clase I
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
NSP	Proteína no estructural
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PP	Placas de Peyer
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Acido ribonucléico
RNAdc	RNA de doble cadena
RT	Transcriptasa reversa
SCID	Inmunodeficiencia severa combinada
SFB	Suero fetal bovino
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
Tc	T citotóxicos
TCR	Receptor de las células T
TD	Timo dependientes
TGF·	Factor de crecimiento y transformación
Th	Células T cooperadoras
TI	Timo independientes
TNF·	Factor de necrosis tumoral
uff	Unidades formadoras de focos
ufp	Unidades formadoras de placas
VP	Proteína viral
β 2·m	β 2· microglobulina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Epidemiología de la infección por rotavirus.*

Las enfermedades diarreicas son la causa más común de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En nuestro país, se ha reportado que en el año 2000, estas enfermedades se ubicaron en el primer lugar de mortalidad en niños de edad preescolar. (Fuente: INEGI, S.S.A. México).

Los rotavirus son los principales agentes etiológicos de gastroenteritis virales, son ubicuos para los humanos y muchas especies animales. La infección es especie específica. El grupo A de rotavirus humano es la causa más frecuente de diarrea aguda en infantes que puede conducir a deshidratación grave y si esta no es atendida a tiempo puede causar la muerte.

La infección por rotavirus en infantes es la causa más común de consultas a pacientes con diarrea. A nivel mundial, se ha estimado que los rotavirus son causantes de aproximadamente 111 millones de eventos de gastroenteritis y de 352,000 a 592,000 muertes de infantes al año, principalmente en países en vías de desarrollo [19].

La diarrea aguda por rotavirus se presenta durante los primeros 3 años de vida. En el recién nacido, las infecciones generalmente van de moderadas a asintomáticas, debido probablemente a la protección ofrecida por anticuerpos maternos adquiridos pasivamente a través de la leche materna. La sintomatología acompaña generalmente a la infección primaria y la edad promedio en que esta ocurre va de los 6 meses a 2 años, seguida por protección contra subsecuentes infecciones sintomáticas o moderadas que ocurren a lo largo de la vida, por esta razón, los casos de infecciones sintomáticas decrecen con la edad. En un estudio realizado en nuestro país, se determinó que la mayor frecuencia de infecciones sintomáticas por rotavirus, fue entre los 6 meses y los 11 meses de edad (estudio realizado con menores de 2 años) [4].

Los rotavirus tienen una distribución mundial y exhiben un alto grado de diversidad en las cepas cocirculantes. En las zonas templadas, las infecciones por rotavirus muestran un incremento marcado en el periodo invernal, con un pico en los meses de enero y febrero, mientras que en climas tropicales, las infecciones ocurren durante todo el año [1-3]. En un estudio realizado por Larrosa, et al., en Guadalajara, Jal., durante el periodo de octubre de 1999 a marzo de 2000, se determinó que en muestras de heces de pacientes menores de 5 años con diarrea aguda, 47% fueron positivas para rotavirus y la mayor incidencia de infecciones por estos virus fue durante los meses de diciembre y enero.

Poco se sabe del modo de transmisión de rotavirus. Aunque esta es extendida primordialmente por la ruta feco-oral, ciertas características epidemiológicas, sugieren que los rotavirus pueden también diseminarse por la ruta respiratoria. Existen factores de riesgo, que favorecen la infección por rotavirus, como son: a) convivencia con niños mayores de 2 años (familiares, guardería, etc.), b) dieta de leche baja en grasas, c) alimentación con leche de formula, y d) condiciones insuficientes de higiene [2].

1.2 Estructura:

a) Antecedentes

Los rotavirus murinos son conocidos como patógenos diarreicos desde la década de los 50's, pero fue hasta 1973, que Ruth Bishop y colaboradores describieron la presencia de partículas virales en biopsias de intestino delgado proveniente de niños con diarrea severa de origen no bacteriano. Este grupo de investigadores los denominó como Rotavirus, ya que al ser observados a través de microscopia electrónica de tinción negativa presentaron una morfología de ruedas de carreta antigua [1-3,6].

Los rotavirus constituyen uno de los géneros de la familia *Reoviridae*. La partícula del rotavirus es de simetría icosaédrica, de 75 nm de diámetro y 100 nm incluyendo las espículas [1-3,6].

b) Genoma viral:

Esta compuesto de 11 segmentos de RNA de doble cadena (RNAdc), cuyos tamaños varían desde 667 hasta 3302pb. El RNA por si mismo no es infeccioso y puede ser separado electroforéticamente generando un patrón único para el genoma del rotavirus. Los primeros 10 segmentos son monocistronicos y el gene 11 es dicistrónico. Los RNA de rotavirus contienen una estructura Cap-5' metilado, seguida por una secuencia no traducible, un patrón de lectura abierto que codifica para el producto proteico, otro grupo de secuencias no codificables y el extremo 3'-citidino terminal y carece de secuencias poliadeniladas. Al coinfectar con varias cepas de rotavirus, sus genomas tienen la capacidad de rearrreglarse debido a que todos los segmentos contienen secuencias consenso en las regiones 5' y 3' [1-3,6].

c) *Estructura viral:*

Hay seis proteínas estructurales del virión (VP: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y 6 no estructurales (NSP: NSP1-NSP6) que participan en el proceso replicativo y en la morfogénesis viral [1,2,6].

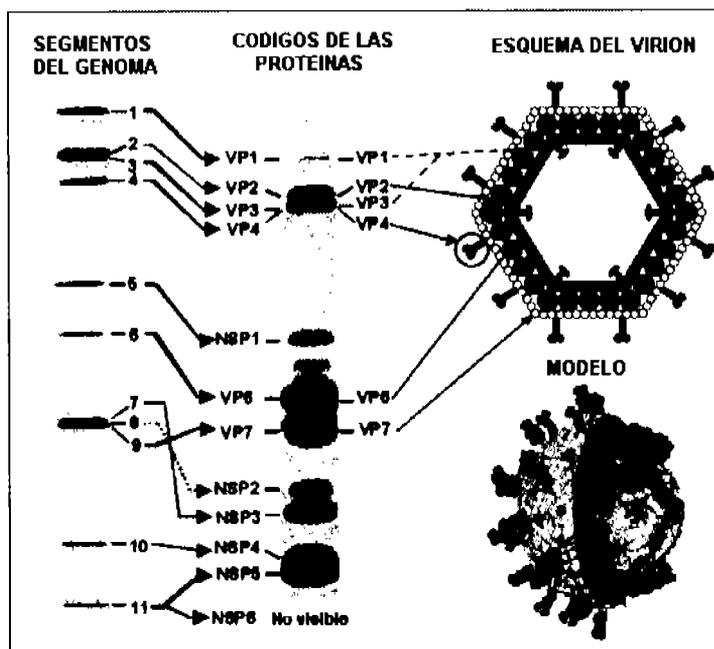


Fig. 1.- Estructura de rotavirus.
(Imagen modificada. Estes MK, 1996[6])

El virión maduro tiene una estructura icosaédrica, (Fig. 1) no tiene capa lipídica externa y consiste en 3 capas proteicas concéntricas a saber:

Nucleocápside o core: la proteína VP2 constituye la capa más interna del virión, que contiene en su interior al genoma viral que engloba 12 moléculas del complejo enzimático VP1-VP3, en un empaquetamiento icosaédrico sobre el cual la capa de VP2 es ensamblada conservando esta morfología. El diámetro de la nucleocápside es de 51 nm, mientras que el grosor de la capa formada por VP2 es de 3.5 nm.

Capa intermedia: constituida por 260 trímeros de la proteína VP6 que rodea la nucleocápside interrumpidos por 132 canales acuosos. El grosor de esta capa es de aproximadamente 10 nm.

Capa externa: consiste de las proteínas VP4 y VP7. La glicoproteína VP7 es el principal componente y está agrupada en 260 trímeros triangulares que asociados entre si forman 132 canales acuosos (12 tipo I, 60 del tipo II y 60 del tipo III). La capa formada por VP7 tiene un grosor de \cong 35 nm.

La función de los canales no ha sido completamente descrita, pero es posible que estén involucrados en la importación de metabolitos para la transcripción de RNA y la exportación de los transcritos nacientes para el proceso de replicación viral.

Dímeros de la proteína VP4 forman 60 espículas que traspasan la capa formada por VP7, insertados en los canales acuosos del tipo I. Las espículas a su vez también interactúan con la cápside intermedia formada por VP6. Estas interacciones de VP4 podrían participar en el mantenimiento de la geometría del virión, así como de los dominios funcionales de las cápsides. La proteína VP4 al ser cortada por tripsina (presente en el sitio natural de la infección), produce las proteínas VP8* y VP5*. Este corte de VP4 está acompañado de un incremento en la infectividad del rotavirus, y con su entrada a la célula [1-3,6].

d) Clasificación.

De acuerdo a las características antigénicas de la proteína VP6, se han descrito al menos 7 grupos de rotavirus (A-G). Se ha reportado infección en humanos y animales con rotavirus de los grupos A, B y C. Mientras que los rotavirus D, E, F y G solo se han aislado de especies animales. Los rotavirus del grupo A, son los más importantes por ser la principal causa de gastroenteritis severa y dentro de este grupo se encuentran los subgrupos I, II, I+II, no-I y no-II, de acuerdo a sus reactividades de VP6 con dos anticuerpos monoclonales.

Debido a que existen dos proteínas blancas de anticuerpos neutralizantes en la cápside externa, VP4 y VP7, surgió una clasificación dual similar a la que se utiliza para los virus de influenza. Para VP7, hay al menos 14 diferentes tipos específicos para la proteína, denominados tipos G (derivado de *glicoproteína*). Para VP4, existen al menos 19 diferentes tipos específicos, llamados tipos P (derivado de proteína sensible a *proteasa*). Todos los tipos G y P pueden ser distinguibles por la secuencia de sus genes. Los genotipos de P se asocian con ciertos serotipos, por lo que parece haber correspondencia entre ambas propiedades. Cada virus tiene un serotipo P indicado por un número que lo precede y es seguido por el genotipo P indicado por un número entre corchetes (ej. P1A[8]). Debido a que VP4 y VP7 están codificados por diferentes segmentos de RNA, se pueden observar diversas combinaciones de tipos G y P en los rotavirus humanos y animales [1-3,6].

e) Ciclo Replicativo:

In vivo, los rotavirus se replican principalmente en los enterocitos maduros del epitelio intestinal, localizados en las puntas de las vellosidades del intestino delgado. La replicación del virus *in vitro* esta limitada a líneas celulares epiteliales intestinales y renales. La mayoría de los estudios de replicación viral han sido efectuados *in vitro* en células de riñón fetal de mono (MA-104), y han sido una gran herramienta de investigación, sin embargo, no representan completamente las interacciones que pueden llevarse a cabo *in vivo*.

El ciclo replicativo de los rotavirus es un fenómeno secuencial y tiene lugar en el citoplasma, este inicia con la unión de las partículas virales a las células a través de las proteínas VP4 (VP5*+VP8*) y VP7. Se ha encontrado que algunas cepas virales se unen a las células de manera dependiente de ácido siálico (AS:ácido N-acetil-neuramico) a través de VP8, aunque la mayoría de virus humanos y animales inician la infección mediante un mecanismo independiente de AS, a través de la integrina celular $\alpha 2\beta 1$ y VP5. Esta interacción también es utilizada por virus que se unen a través de AS. Posterior a la unión del virus a la célula, se da paso a interacciones con las integrinas $\alpha\beta 2$ y $\alpha\beta 3$ a través VP7 y la hsc70 por VP5 [1-3,6,29].

La internalización del virus ocurre entre los 60-90 minutos posteriores a la unión con la célula y se incrementa por proteólisis viral. Se ha propuesto que la entrada a la célula puede ocurrir por penetración directa a través de la membrana plasmática, por endocitosis mediada por un receptor o por ambos mecanismos. Durante la penetración a la célula, el virión pierde la capa externa, VP7 y VP4 (VP5*+VP8*) y genera partículas virales de doble capa. El desnudamiento, es necesario para la activación de la transcriptasa viral (VP1) que da inicio a la transcripción dentro de la partícula de doble capa. Se ha postulado que los transcritos salen simultáneamente a través de los canales de tipo I, y tienen 2 funciones: 1) son traducidos para sintetizar las proteínas virales y 2) son las cadenas molde a partir de los que se sintetiza RNAdc para constituir el genoma de la nueva progenie [1-3,6].

Una vez que los transcritos han sido exportados del virión al citoplasma, comienzan a ser traducidos en polisomas y en retículo endoplásmico (RE) aumentando la síntesis de todas las proteínas virales y disminuyendo las proteínas celulares. Cuando se han acumulado las proteínas virales, se forman grandes inclusiones en el citoplasma llamadas viroplasma, en donde se ensamblan las partículas de doble capa. La encapsidación del genoma se lleva a cabo por la interacción del RNA mensajero (RNAm) con las proteínas de la nucleocápside. Al formarse la nucleocápside, se inicia la internalización del RNAm dentro de la misma así como la síntesis de la hebra complementaria con la participación de algunas proteínas no estructurales, como intermediarios de la replicación. La adición de los trímeros de VP6, activa su actividad de

replicasa y transcriptasa, formando partículas de doble capa que migran hacia el RE por interacciones de VP6 con la proteína NSP4, donde adquieren la capa externa. NSP4 se encuentra translocada en la membrana e interacciona con la proteína VP4 para inducir la gemación de las partículas al lumen de este organelo adquiriendo una capa lipídica temporal que se pierde al ensamblarse la capa externa del virión. El ciclo de la infección finaliza cuando la progenie viral es liberada por lisis de las células huésped, provocada por las alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática durante la infección. Sin embargo también se ha descrito la salida de los virus en ausencia de la destrucción celular [2,6].

f) Patología:

Los rotavirus infectan las células apicales de los vellos del intestino delgado, causando muerte celular y desescamación, las lesiones resultantes varían dependiendo de la especie y la edad del animal infectado. Por ejemplo, rotavirus porcinos causan una gran cantidad de daño tisular, mientras que para los murinos, la destrucción es más selectiva. En la infección de especies jóvenes se produce mayor destrucción celular que en las infecciones en los adultos. El despuntamiento de los vellos intestinales y la vacuolación de los enterocitos puede ser observada a pocas horas de infección, antes de que sea detectable el antígeno viral. En la mayoría de las especies, la mayor producción de antígeno viral en el intestino puede ser observada entre las 48 y las 72 horas postinfección y una vez resuelta la infección, la morfología celular regresa a su normalidad en alrededor de 5-7 días [2,7].

La necrosis de los ápices de las vellosidades intestinales reduce la digestión, causando diarrea debido a la mala absorción de carbohidratos, provocando atrofia y diarrea osmótica secundaria, induciendo así la hiperplasia de las células crípticas y el aumento en las secreciones. La proteína NSP4 ha sido asociada a la inducción de diarrea, debido a los efectos de enterotoxina observados al ser administrada exógenamente [1-3,6].

1.3 Generalidades de la respuesta inmune.

a) Respuesta inmune innata.

El sistema inmune innato usa proteínas solubles o bien receptores de membrana celular para identificar sustancias nocivas para el organismo, que usualmente reconocen estructuras de carbohidratos. El complemento es uno de los principales efectores de inmunidad innata; consta de proteínas solubles que al interactuar con carbohidratos y tienen la capacidad de lisar bacterias o células infectadas. Los macrófagos (MΦ), las células dendríticas (CDs) y las células asesinas naturales (NK) también están implicadas en la respuesta innata a un antígeno.

Los MΦ y las CDs endocitan partículas o conjugados solubles que se unen a su receptor de manosa en ambos o al receptor de lipopolisacaridos para los MΦ, este proceso estimula su activación y la síntesis de químicos y citocinas que inducen sus funciones antimicrobianas y las de otras células, así como la promoción del desarrollo y el crecimiento de las células T cooperadoras (Th). Las células NK tienen receptores de membrana tipo lectina que participan en el reconocimiento de las células blanco destinadas a citolisis [58].

b) Respuesta de células B.

Las células B provienen de médula ósea. Expresan un receptor de unión a antígeno, el receptor de células B (BCR), que es un anticuerpo insertado en la membrana plasmática, que al unir antígeno da inicio a la respuesta inmune humoral. Los BCRs para las células B vírgenes son de los isotipos IgM e IgD, mientras que en las células efectoras y de memoria son de los isotipos IgG, IgA e IgE.

Existen dos clases de células B. Las células B2 o células B convencionales, que son parte de la respuesta inmune adaptativa. La activación y selección clonal de las células B2 vírgenes da como resultado la generación de células plasmáticas productoras de anticuerpos y células B de memoria. Dependiendo del ambiente y la naturaleza del antígeno la activación puede darse de dos maneras. Primero, por antígenos timo-dependientes (TD) donde las células B que requieren del contacto estrecho con las células T cooperadoras (Th) y de la secreción de citocinas. Segundo, la activación por antígenos timo-Independientes (TI) se da a través de algunos componentes de la pared celular bacteriana, como son los lipopolisacaridos o moléculas altamente repetitivas, como son las proteínas poliméricas y/o unidades de polisacáridos. La respuesta humoral a antígenos TI es muy débil, sin generación de memoria y con secreción de anticuerpos del tipo IgM [15]. La activación de las células B por

antígenos TD requiere de 2 señales: el reconocimiento de antígeno al BCR y una señal coestimuladora, que consiste del acoplamiento de las moléculas membranales CD40 (cél. B) y de su ligando CD40L (Th). Las células B1 se encuentran principalmente en la cavidad peritoneal y pleural, contribuyen en la respuesta innata a través de anticuerpos contra antígenos de carbohidratos, sin generar memoria inmunológica. Son la fuente principal de anticuerpos naturales IgM polireactivos de baja afinidad, diseñados para la prevención y protección urgente contra un antígeno y que son producidos sin haber estado en contacto previo con el mismo [62-63]. Las células B1 pueden producir también anticuerpos del tipo IgA de manera TI [33,59].

c) Respuesta de células T.

Al igual que las células B, las células T provienen de médula ósea, pero estas alcanzan su madurez en el timo, donde son seleccionadas para responder a antígeno extraño, de ahí entran a un ciclo de circulación entre el flujo sanguíneo y los órganos linfoides hasta encontrar su antígeno correspondiente y dar inicio a la respuesta inmune adaptativa, proliferando y diferenciándose en células de memoria y células efectoras. Las células T, al igual que las células B, reconocen antígeno a través de un receptor, el receptor de células T (TCR), constituido por dos cadenas (α y β), insertadas en la membrana celular y sin dominio citoplásmico. El TCR está asociado a un complejo proteínico denominado CD3, conformado por 4 proteínas (γ , δ , ϵ y ξ) insertadas en la membrana celular, el cual contiene dominios citoplasmáticos y que dan inicio al proceso de transducción de señales hacia el núcleo. El TCR se asocia a su vez con las moléculas CD4 o CD8, que tienen la capacidad de unirse con el complejo principal de histocompatibilidad de clase II y I (MHC II y MHC I) respectivamente. Su función es el reconocimiento de antígeno en forma de péptido y de las moléculas del MHC como propias del organismo [31-33].

Las células T vírgenes se activan solo al reconocer antígeno y si al mismo tiempo reciben una segunda señal coestimuladora de las células que lo presentan. Solo las células dendríticas (CDs), los macrófagos (MØs) y las células B son capaces de coexpresar las moléculas del MHC y las moléculas coestimuladoras. Las mejores caracterizadas son las glicoproteínas B7.1 y B7.2 (moléculas B7), que son homodímeros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). Sus ligandos son CD28 y CTLA-4(CD152) (en la célula T) y actúan antagonicamente. La unión de B7 con CD28, induce un estímulo positivo que aumenta de la producción de IL-2 y otras citocinas, con el fin de prevenir la inducción de tolerancia (anergia) en las células T; mientras que la unión con CTLA-4, actúa como señal inhibitoria, con el fin de mantener la homeostasis [31, 33-35].

Funcionalmente, las células T CD3+ se clasifican en 2 grupos:

- T CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺: reconocen antígeno peptídico de 8-10 aa, proveniente de patógenos que se multiplican en el citoplasma, unido al MHC I. Al activarse se diferencian como linfocitos T citotóxicos (Tcs), y su función primordial es la eliminación de las células infectadas [31, 33-35].
- T CD3⁺CD4⁺ CD8⁻: reconocen antígeno peptídico de 14-25 aa derivado de antígenos internalizados a las células por endocitosis, asociado al MHC II. Se conocen como linfocitos T cooperadores (Th). Su función principal es la secreción de citocinas que inducen la proliferación y diferenciación celular, así como la secreción y el cambio de isotipo de las Igs en las células B [31, 33-35].

i) El MHC I y la activación de los linfocitos Tc.

Las moléculas del MHC I se expresan en todas las células nucleadas, consiste básicamente de un dímero conformado por una glicoproteína de membrana, denominada cadena α (45 Kd), producto polimórfico de los genes del MHC I, que está asociada a una pequeña proteína soluble denominada β_2 -microglobulina (β_2 -m) [31, 33-35].

Las moléculas del MHC I despliegan fragmentos proteínicos sintetizados en el interior de la célula, como son las proteínas virales o de parásitos que las infectan y que son degradadas por un complejo enzimático denominado proteasoma. Los péptidos obtenidos (8-10 aa) son selectivamente acarreados y transportados al interior del RE por moléculas transportadoras específicas denominadas TAPs, en donde son cargados en el surco del MHC I formado por la cadena α , para ser enviados a la superficie celular a través de la red de Golgi y presentar el antígeno a la célula T CD8⁺ (Tc) [31, 34, 35].

La función de los linfocitos T citotóxicos (Tcs) es la destrucción de patógenos intracelulares que no son accesibles a los anticuerpos, eliminando las células infectadas por apoptosis sin la destrucción de los tejidos sanos [31, 33, 35].

El principal mecanismo por el cual actúan los linfocitos Tcs, es la liberación de gránulos líticos, que contienen monómeros de *perforina* y varias proteasas de serina llamadas *granzimas* (o fragmentinas). Cuando un linfocito Tc reconoce antígeno peptídico presentado por el MHC I en la célula blanco, se une a ella estrechamente formando un conjugado y reorganiza su citoesqueleto para distribuir los gránulos líticos hacia el sitio de unión con la célula, en donde los libera por exocitosis. Ahí perforina polimeriza insertándose en la membrana celular formando poros cilíndricos que destruyen la integridad de la membrana permitiendo el intercambio de fluidos, dando como consecuencia la muerte

celular por necrosis. Las granzimas al ser liberadas entran a la célula a través de estos poros, para mediar procesos proteolíticos, iniciar la cascada de caspasas y promover la fragmentación del DNA celular y viral, activando la vía apoptótica en la célula blanco. Las granzimas también inducen apoptosis por la vía de Fas [31,33, 35].

Otro mecanismo utilizado por los linfocitos Tcs es la inducción de apoptosis por la vía de FAS. Esta molécula está desplegada en la membrana de las células blanco y al unirse a su ligando, anclado a los linfocitos Tcs, se activa la cascada de caspasas. Los linfocitos Tcs también actúan mediante la liberación de citocinas, como IFN- γ y TNF- α y β , que inhiben la replicación viral e inducen la presentación de antígeno por el MHC I, activan macrófagos y eliminan las células infectadas que interactúen con el TNFR-I [31, 35].

ii) El MHC II y la activación de las células Th.

Las moléculas del MHC II se expresan únicamente en la superficie de las células presentadoras de antígeno profesionales (CPAs). Al unir peptido antigénico son desplegadas en la membrana plasmática para activar a las células T CD4+ [33, 43]. El MHC II es un heterodímero conformado por 2 glicoproteínas polimórficas transmembranales denominadas cadenas α (30-35 Kd) y β (25-30 Kd). Ambas son producto del conjunto de genes del MHC, que al ser traducidas son translocadas en la membrana del RE en donde se ensamblan con una tercer glicoproteína integral de membrana denominada cadena invariante (I). La I tiene varias funciones: 1) facilita la asociación de las cadenas α y β ; 2) se asocia al surco formado por ambas cadenas para evitar la unión de los péptidos que se localizan en el RE; y 3) promueve la exportación del MHC II hacia Golgi para ser desviados a la vía de endosomas, evitando la vía de secreción de las moléculas integrales de la membrana plasmática [43-45].

Las moléculas son transportadas a compartimentos o vesículas del MHC II (MIIC o CIIV) con características internas similares a los lisosomas y los endosomas tardíos, en donde tendrán acceso a los antígenos internalizados por la vía endosomal y se lleva a cabo la degradación de la I. Las moléculas del MHC II unen péptidos (14-25 aa) que son producto de la degradación por proteasas del antígeno internalizado, en un ambiente endosomal-lisosomal en las CPAs [43-45].

El complejo péptido-MHC II es enviado a la superficie celular para presentar el antígeno y activar a las células T CD4+ (Th), por un mecanismo aún no descubierto, pero que podría ser por fusión directa de las vesículas a la membrana plasmática

Durante la respuesta inmune las células Th vírgenes activadas por antígeno se diferencian en al menos 2 clases funcionales adquiriendo fenotipos polarizados que dependen de las citocinas que estas secreten. Las células Th, a través de las citocinas auxilian en la generación de una respuesta inmune apropiada a cada invasor o antígeno [47]. Estas células juegan un papel muy importante en la inmunidad antiviral actuando a través de varios mecanismos: 1) contribuyen al control de la infección mediante la secreción de citocinas que pueden estar involucradas en el reclutamiento y activación de MΦs, 2) promueven la diferenciación, la producción de anticuerpos y el cambio de isotipo de las Igs de las células B, 3) promueven la expansión de las células CD8+ y su activación en linfocitos Tcs [35,39]. Las células Th también han mostrado tener actividad antiviral en sistemas *in vivo* mediante la producción de citocinas tales como IFN-γ y TNF [35, 39, 48].

d) Citocinas

Las citocinas son moléculas regulatorias de bajo peso molecular, secretadas por una gran variedad de células en respuesta a diferentes estímulos. Su función principal es la comunicación intercelular para asistir el desarrollo de las células inmunoefectoras. Las citocinas se unen a receptores específicos localizados en las membranas de las células blanco, induciendo diferentes vías de transducción de señales y alterando la expresión de sus genes. En general, las citocinas y sus receptores son altamente afines con constantes de disociación (Kd) que van de 10^{-10} a 10^{-12} M, y a muy bajas concentraciones tienen efectos biológicos importantes. Así las citocinas secretadas por un pequeño número de células activadas por antígeno pueden influenciar la actividad de numerosas células involucradas en la respuesta inmune [15].

En general, las citocinas pueden actuar de manera autocrina, paracrina, y en casos extremos tienen un efecto endocrino. Normalmente su actividad está restringida al ambiente tisular en el cual fueron generadas. Las citocinas estimulan o inhiben la activación, proliferación y diferenciación celular, regulando de esta manera la secreción de anticuerpos y de otras citocinas, con el fin de modular la intensidad y la duración de la repuesta inmune. Las citocinas presentan propiedades de pleiotropia, redundancia, sinergia, antagonismo e inducción de cascadas [15, 16].

Los principales grupos de citocinas son las interleucinas; los interferones alfa, beta y gamma; los factores de necrosis tumoral alfa y beta; los factores estimulantes de colonias G, M, G/M; los factores de transformación del crecimiento alfa y beta; y las quimiocinas de los subgrupos CC y CXC.

e) *Respuesta inmune tipo Th0, Th1, Th2, Th3 y Tr*

i) *Th0.*

Las células Th0 representan probablemente a una población de células T CD4+ parcialmente diferenciadas a células efectoras (pre Th). Se ha propuesto que estas células son las precursoras de los fenotipos diferenciados Th1 y Th2, dependiendo del medio ambiente de citocinas en el que se encuentren las células pre Th. En presencia de IL-12 se induce el fenotipo Th1 y en presencia de IL-4 el Th2.

Estas células tienen un perfil intermedio en el patrón de secreción de citocinas que presentan los fenotipos de las células polarizadas hacia Th1 y Th2, aunque en niveles mucho más bajos [46].

ii) *Th1*

La respuesta tipo Th1 está asociada a la secreción de IL-2, IFN- γ y TNF- β . Por medio de las cuales se modula la respuesta inmune mediada por células. Estas citocinas proveen ayuda a las células B aumentando la respuesta de anticuerpos, el cambio de isotipo a IgG2a por IFN- γ , y la activación de macrófagos [41, 46, 47, 51].

IL-12 e IFN- γ proveen señales importantes para la inducción de la respuesta tipo Th1, ambas son producto de la activación por antígeno del sistema inmune innato y contribuyen a la activación de la respuesta de los linfocitos Tcs. IFN- γ , derivado de las células NK activadas por antígeno induce la polarización de las células Th durante su compromiso primario. Esta acción es mediada por el transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT1) que induce la expresión del factor de transcripción T-bet, y que a su vez promueve la transcripción de IFN- γ y la subunidad β 2 del receptor del IL-12 [46]. En el ratón IFN- γ por si mismo no es suficiente en el desarrollo del fenotipo Th1, pero auxilia a regular la habilidad de las células Th a responder a IL-12. [47]

IL-12 es una citocina crítica en el desarrollo del fenotipo Th1. Proviene de CD8 o M Φ s activados, amplifica la producción de IFN- γ y del IL-18R que abre una nueva vía para la producción de IFN- γ . La subunidad β 2 del IL-12R no se expresa en las células T vírgenes, es inducida en la activación a través del TCR y se regula por IL-4 e IFN- γ . IL-4 inhibe la expresión de la subunidad, mientras que IFN- γ bloquea la acción de la IL-4, inhibiendo el desarrollo y la actividad de las células Th2. [46-48]

iii) Th2

La secreción de las citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 es característica de la respuesta tipo Th2 [46-48]. Las células cooperadoras con perfil Th2 son muy eficientes en la promoción de la producción, secreción y cambio de isotipo de los anticuerpos. Las citocinas de la respuesta tipo Th2 son necesarias para la elaboración de IgG1, IgE contra parásitos e IgA en infecciones mucosales, así como la estimulación de eosinófilos y células cebadas [46].

Las fuentes de señales innatas para la diferenciación de las células T CD4+ hacia el fenotipo Th2, no han sido discernidas aún. Se ha propuesto que la ausencia de señales de activación del sistema innato que inhiben la diferenciación a Th2, como es el caso de IFN- γ e IL-12, permite la estimulación autocrina a través de IL-4 en las células T activadas [47].

IL-4 promueve la diferenciación de las células T CD4+ hacia el fenotipo Th2, por medio de la molécula citosólica STAT6 que induce la producción de los factores de transcripción C-MAF y GATA-3 y que a su vez promueven la producción de citocinas propias de este fenotipo [48].

Algunas citocinas producidas por las células Th2 (IL-4 e IL-10), inhiben el desarrollo y la actividad de las células Th1 y de los macrófagos [46].

iv) Th3

Se ha establecido que en la respuesta inmune dirigida por las células Th1 y Th2, en algunas ocasiones están influenciadas por un tercer tipo de células T, cuya función principal es la regulación o supresión de la respuesta inmune mediada por los fenotipos Th1 y Th2.

Estas células tienen un perfil único de citocinas caracterizado por la producción de altos niveles de TGF- β . Son inmunoregulatoras o inmunosupresoras y juegan un papel importante en la prevención y el desarrollo de enfermedades observadas en modelos experimentales de colitis, diabetes, así como en la inducción de tolerancia oral.

TGF- β es mediador de los efectos pleiotrópicos del sistema inmune e inhibe la actividad de macrófagos mediada por IFN- γ . Algunos estudios sugieren que durante infecciones virales, la presencia de TGF- β inhibe la actividad de las células T. Además, se ha observado que a bajas concentraciones de TGF- β , se incrementa la respuesta de las células T CD8+, mientras que se inhibe la de las células NK y CD4+. A altas concentraciones, se puede inhibir la proliferación de todos los linfocitos [50].

TGF- β , es la principal citocina involucrada en la inducción del cambio de isotipo de las inmunoglobulinas hacia IgA por las células B.

v) Las células T regulatorias (T_R):

Las células regulatorias son linfocitos T CD4⁺ que expresan altos niveles de la cadena α (CD25) del receptor para IL-2, donde IL-2 juega un papel importante en el desarrollo de la función de estas células. Las células T_R inhiben la respuesta inmune mediante la secreción de IL-10, que inhibe la activación de M Φ s y antagoniza las acciones de IFN- γ , dando como consecuencia la inhibición de la activación de las células T y las reacciones inmunes mediadas por células.

Estas células pueden o no secretar TGF- β y tener funciones antiinflamatorias y actividades inmunosupresoras [59].

f) Respuesta inmune de la mucosa intestinal:

El epitelio de las mucosas se caracteriza por estar constituido por una capa de células que separa el tejido del lumen mucosal. Las células epiteliales están íntimamente unidas a través de las uniones estrechas (tight junctions), que restringen el paso de moléculas pequeñas menores a 2 kDa. Una vez que se han rebasado las barreras naturales de protección, la mucosa es el principal sitio de entrada de antígenos. Afortunadamente, el sistema inmune de mucosas está altamente integrado, finamente regulado, anatómicamente y funcionalmente dividido en tejidos inductivos (sitios de inducción) y tejidos efectoros (sitios efectoros) de la respuesta inmune.

El epitelio intestinal es bifuncional, por un lado controla el acceso de antígenos potenciales, mientras que al mismo tiempo lleva a cabo las funciones digestivas y la absorción de nutrientes alimenticios. En la mucosa intestinal, los principales sitios de inducción de la respuesta inmune son las placas de Peyer (PP), que se localizan dispersas a lo largo del intestino y son el sitio donde se lleva a cabo el procesamiento y presentación de antígeno. Las PP están formadas por folículos linfoides de células B con centros germinales, que están rodeados por zonas que contienen predominantemente células T y células presentadoras de antígeno (CPAs: CD y M Φ). Las PP están cubiertas por un domo subepitelial cuyas poblaciones celulares principales son M Φ s y CDs, así como pequeñas cantidades de células plasmáticas y de linfocitos T y B. El domo está cubierto a su vez por el epitelio asociado a folículos (EAF), constituido por células epiteliales especializadas denominadas células M, células epiteliales y linfocitos intraepiteliales T $\gamma\delta$ [8,9].

Las células M son un sitio importante de invasión para bacterias, virus y protozoarios. Su población en el EAF asciende hasta en un 20% del total. Estas

células tienen la capacidad de transportar partículas inertes a las PP a través de mecanismos pasivos. A diferencia de las células epiteliales, las células M carecen de una cubierta de glicoproteínas en el ápice de las mismas (gliocalix), lo que las hace más susceptibles al contacto y acceso de las partículas antigénicas. Las células M de las PP del ratón, no así sus enterocitos, expresan integrinas $\beta 1$ en la superficie apical y que actúan como receptor de invasores. [10]

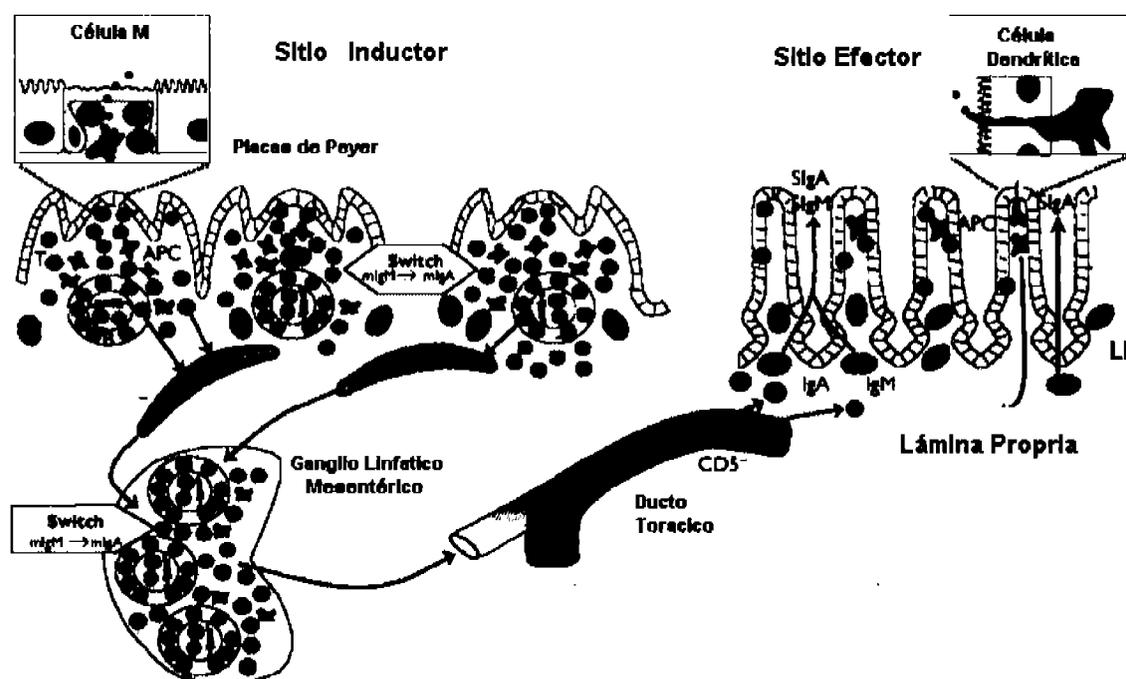


Fig. 2. Modelo de la respuesta inmune de mucosas. (Modificado de Brandtzaeg, Aekkevoold y Morton, 2001) [60]

Dentro del sistema de entrada de antígeno, se han descubierto un tipo de células dendríticas (CDs) que tienen la capacidad de extender sus dendritas a través de las uniones estrechas (tight junctions) de las células epiteliales sin destruir la integridad epitelial, para muestrear antígeno luminal y presentarlo en PP como antígeno inerte o procesado [11,18].

Los linfocitos T y B activados por antígeno en las PP viajan a los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y son distribuidos a través del ducto torácico, y realizan homming al sitio efector de la respuesta inmune intestinal que es la lámina propia (LP), en donde las células se diferencian para llevar a cabo sus funciones efectoras. Los linfocitos expresan receptores de homming o de moléculas de adhesión (adresinas), así como receptores de quimiocinas, que determinan el compartimiento inmune en el cual funcionan. Las adresinas se expresan en las células endoteliales de las altas vénulas endoteliales (HEVs), siendo la molécula de adhesión celular-la adresina mucosal MAd-CAM1, la

adhesina que se expresa principalmente en las HEVs en las PP y la LP, y que juega un papel importante en el reclutamiento de los linfocitos activados en estos compartimentos. El ligando para esta adhesina, presente en los linfocitos efectores y de memoria, es un heterodímero de las integrinas $\alpha 4$ y $\beta 7$. Así $\alpha 4\beta 7$ es el principal receptor de direccionalidad de mucosas en PP y LP [8, 12].

La LP intestinal está localizada a lo largo del intestino, al interior de las vellosidades y está interrumpido solamente en los sitios donde se localizan las PP. Este sitio contiene todos los componentes celulares necesarios para contrarrestar el antígeno, como son: las células epiteliales, células T (Tc CD3+CD8+ y Th CD3+CD4+); células B, células cebadas, MØs, CDs y eosinófilos, en donde los MØs y las CDs son los principales procesadores y presentadores de antígeno [17].

1.4 *Respuesta inmune en la infección por rotavirus.*

a) *Modelo de infección por rotavirus en el ratón adulto:*

La infección por rotavirus ha sido ampliamente estudiada en diversas cepas murinas, debido a la facilidad de manejo, mantenimiento, disponibilidad y economía de las diferentes cepas, así como la diversidad de reactivos necesarios para el estudio de la respuesta inmune.

Los ratones neonatos son susceptibles a diarrea inducida por rotavirus durante un periodo de vida bastante corto, los primeros 15 días, lo que hace difícil su estudio. Sin embargo, los ratones adultos no desarrollan el episodio diarreico, pero son igualmente susceptibles a la infección por rotavirus, con periodos similares de incubación y de excreción viral, así como una equivalente inducción de anticuerpos del tipo IgA, que a su vez correlaciona con la eliminación del virus. En ambos casos, una primera exposición al virus confiere protección a la reinfección [14].

b) *Respuesta innata:*

Los mecanismos innatos que median la limpieza de la infección por rotavirus aun no han sido caracterizados. Se ha propuesto a las células epiteliales, las CDs, MØ y los linfocitos intraepiteliales, como fuentes importantes de secreción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas e IFNs que pudieran favorecer el inicio de la respuesta inmune y el bloqueo de la producción de partículas virales. En este contexto, se han descrito que en la respuesta a la infección por rotavirus, las células epiteliales *in vitro* secretan factores de crecimiento y citocinas implicadas en quimioatracción y activación de linfocitos y monocitos y que podrían ser importantes en la inducción de la respuesta inmune [13].

c) La respuesta de las células B en la infección por rotavirus.

En el ratón, la aparición de anticuerpos IgA intestinales específicos al virus, correlaciona con la resolución de la infección primaria. Estos anticuerpos persisten por al menos 1 año, durante el cual el ratón está protegido contra una reinfección. Los eventos de resolución-protección corresponden con la aparición de anticuerpos IgA intestinales, no así con la de la producción de anticuerpos de los tipos IgG en suero [14,23,26]. Se ha demostrado que la ausencia de anticuerpos del tipo IgA en el ratón no limita al sistema inmune en el proceso de limpieza de la infección primaria por rotavirus, por lo que se desarrollan mecanismos compensatorios para la producción de isotipos alternos de Igs secretorias en heces y que proveen protección. Esta acción puede ser independiente de la actividad de las células CD4+ y CD8+ [28,30].

Como respuesta a la infección primaria por rotavirus, se ha demostrado que la población de las células B se incrementa considerablemente en las PP y GLM y los anticuerpos secretados por las mismas en estadios tempranos son principalmente del tipo IgM, y que al avanzar la infección son del tipo IgA [20]. Las células secretoras de estos anticuerpos se localizan principalmente en LP y PP intestinales y presentan el fenotipo de dirección a mucosa intestinal $\alpha\beta 7^+$ [22,25,26]. Se ha descrito que para la resolución de la infección primaria por rotavirus en el ratón, las células B son importantes, más no indispensables, pero son absolutamente necesarias para conferir protección ante una reinfección. [23,28,29].

Se ha demostrado que en la ausencia de células T en el ratón, hay una baja inducción de anticuerpos del tipo IgA intestinales para rotavirus [22]. Inicialmente se había propuesto que las células B1 eran las responsables de la producción de estos anticuerpos. Pero se ha demostrado que estas solo secretan anticuerpos policlonales que no son capaces de abatir la infección por rotavirus en ratones SCID y que las células B2 son la fuente de anticuerpos del tipo IgA específicos para rotavirus y que probablemente son activadas por el mecanismo TI a través de los epitopos altamente repetitivos en la estructura icosaédrica de los rotavirus [27].

En conjunto, las células B y T son indispensables para la completa resolución de la infección primaria por rotavirus; ya que se ha descrito que ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID), así como con ratones knock out Rag-2 (-/-), no resuelven por completo la infección por rotavirus [17,21].

d) La respuesta inmune de las células T CD8⁺ (Tc) en la infección por rotavirus.

Se ha demostrado que en el ratón, las células CD8⁺ son capaces de proveer protección contra la diarrea y de resolver la infección primaria por rotavirus [36, 37]. Estas células son esenciales para la pronta resolución de la infección, pero no son indispensables para llevar a cabo este proceso, ni para la inducción de protección. Su ausencia no afecta la respuesta de anticuerpos, ni la concentración de IgAs en las heces [22, 23, 28, 38, 39].

Las investigaciones acerca de los mecanismos usados por las células T CD8⁺ para llevar a cabo su función efectora frente a la infección por rotavirus, han sido realizadas principalmente con ratones KO para perforina y FAS. Se ha reportado que las actividades de estas moléculas no son esenciales para la limpieza de la infección viral, y que las células T CD8⁺ que carecen de ellas, usan mecanismos alternos para resolver satisfactoriamente la infección por rotavirus [28,40].

Es de especial interés el estudio de los mecanismos por los cuales se realiza el reclutamiento de los linfocitos a los sitios efectores en la mucosa intestinal. Se ha descrito que las células CD8⁺ funcionales para rotavirus consisten principalmente en aquellas que contienen los fenotipos celulares de memoria que despliegan el receptor de direccionalidad mucosal $\alpha 4\beta 7^{hi}$ [41]. Por otro lado, en el modelo para rotavirus, se ha propuesto la existencia un mecanismo alternativo de direccionalidad para las células CD8⁺ independiente de $\alpha 4\beta 7$, que no es tan eficaz, pero que posiblemente aplicaría para otros fenotipos celulares [28,42].

e) La respuesta inmune de las células Th en la infección por rotavirus.

La respuesta inmune de las células Th, así como el mecanismo por el cual estas células intervienen en el proceso de limpieza de la infección por rotavirus no ha sido ampliamente estudiada.

Se ha descrito que en la infección por rotavirus en el ratón, estas células juegan un papel importante en la completa resolución de la infección y en la producción de anticuerpos IgA intestinales e IgM, IgG e IgA séricos específicos a rotavirus [22, 39]. Así mismo, se ha demostrado que las células CD4⁺ intervienen en varios mecanismos para la resolución de la infección, incluyendo la producción de citocinas que inducen la expansión y maduración de las células B y de las células T CD8⁺ [28,39]

En estudios de proliferación en respuesta a la estimulación por rotavirus de células humanas CD4+, se ha demostrado que en una infección natural por rotavirus, la respuesta proliferativa de estas células está asociada a la adquisición del fenotipo de memoria y de homing intestinal $\alpha 4\beta 7+$. [52]

f) Citocinas en la infección por rotavirus.

Los modelos de estudio hasta ahora descritos para la detección de citocinas durante la infección por rotavirus en el ratón, están basados principalmente en estudios *in vitro* con células humanas, células MA-104 o de ratón. De estos estudios, la mayoría están basados en la detección de quimiocinas durante fases tempranas de infección.

Se ha descrito que células epiteliales de colon humanas HT-29 estimuladas con rotavirus secretan altos niveles de IL-8. También se induce la expresión de los genes que tienen promotores con el sitio de unión para el factor de transcripción NF- κ B, el cual se activa y trasloca al núcleo como consecuencia de la infección por el virus, como son las citocinas GM-CSF, IFN- α , y las quimiocinas IP-10, Rantes y MCP1. En estudios realizados con el modelo murino de infección por rotavirus, se ha descrito que en tejido intestinal se induce RNAm para citocinas que incluyen el promotor NF- κ B, como TNF- α , IFN- β , IL-1 α y las quimiocinas IP-10, Rantes, MCP1, MIP-2 y MIP-1B todas son secretadas de manera independiente de la actividad de células cebadas y de células T [13, 53].

Se ha demostrado que en la infección por rotavirus en el ratón, la actividad de los interferones no es indispensable para llevar a cabo la limpieza de la infección, ni previenen la inducción de la diarrea, pero su ausencia afecta negativamente la secreción de anticuerpos del tipo IgA en heces, así como el título de anticuerpos del tipo IgG2a [40, 55].

IL-6 es una citocina involucrada en el desarrollo de las células B productoras de anticuerpos del tipo IgA. Se ha demostrado que IL-6 es una citocina indispensable para el control de la infección por rotavirus, en la producción de anticuerpos IgA intestinales específicos para rotavirus y la producción de los anticuerpos IgA, IgM e IgG y sus subclases en suero [56].

Se ha descrito que en estudios de reestimulación *in vitro* con rotavirus RRV, de células provenientes de PP y de bazo de ratones adultos infectados con rotavirus EHPw, y a través de ensayos de ELISPOT, se encontró la inducción

de la producción de citocinas de los perfiles Th1 y Th2, como son IFN- γ , IL-10 e IL-5, en las células de bazo e IL-4 en las células de PP, que provienen principalmente de las células T CD4+ de memoria y los perfiles de producción de citocinas son diferentes en cada sitio [56, 57]. Estos estudios demuestran que en la infección por rotavirus se genera memoria, pero no refleja cual es el ambiente de citocinas en el que se desarrolla la respuesta inmune humoral y celular *in vivo*, responsable de la resolución de la infección viral y en el que se lleva a cabo la inducción de las células de memoria que confieren protección a reinfecciones.

2. Justificación

El hecho de que ratones infectados con rotavirus puedan montar una respuesta inmune de células Tc y humoral, que incluye la inducción de anticuerpos IgA intestinales, así como IgA e IgG y los subtipos IgG1 e IgG2a en suero, sugiere que en respuesta a la infección primaria, se genera un patrón de citocinas tipo mixto y no prolongado a ningún subtipo específico tanto en el sitio de inducción de la respuesta inmune intestinal, PP, así como en los diferentes órganos linfoides asociados a la mucosa intestinal, que contribuyen de manera importante en la inducción de la respuesta inmune.

A pesar de existir muy poca información en relación a este tipo de respuestas en mucosas, las investigaciones sobre la inducción de la respuesta inmune de citocinas para rotavirus están basadas en el análisis de la respuesta inmune secundaria *in vitro*, en las que se observa un balance de las respuestas tipo Th1 y Th2, que no necesariamente refleja lo ocurrido en sistemas *in vivo* durante las infecciones primarias.

Actualmente el patrón de citocinas en la infección primaria a nivel intestinal por rotavirus en el ratón no ha sido descrito, por lo que es de especial interés el análisis de las mismas debido a que el conocimiento de la inducción de dicho patrón podría aportar datos importantes para la inducción de una respuesta inmune adecuada en desarrollo de vacunas para rotavirus. De esta manera, en este trabajo nos propusimos analizar el perfil de citocinas representativas de los tipos Th1, Th2 y Th3 en PP y GLM de ratones infectados con un rotavirus homólogo, a través del análisis del RNAm para las diferentes citocinas y correlacionar su perfil con los isotipos de inmunoglobulinas producidas en la primoinfección.

3. Hipótesis

Es posible que inicialmente se encuentre un balance de citocinas tipo Th1/Th2 placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos y que este sea similar en ambos órganos, aunque con diferentes cinéticas. En cambio esperamos niveles constitutivos altos de citocinas tipo Th3, inducibles y con distintas cinéticas en ambos órganos. Así mismo estos perfiles correlacionarán con los isotipos de inmunoglobulinas producidas.

4. *Objetivos*

Objetivo General:

Analizar el perfil de citocinas generado en órganos linfoides asociados a mucosa intestinal en la infección por rotavirus en un modelo de ratón adulto.

Objetivos Particulares:

1. Montar el sistema de infección intestinal por rotavirus en ratones adultos BALB/c usando el rotavirus homólogo silvestre EDIM.
2. Montar el sistema de RT-PCR semicuantitativo para determinar los niveles de mensaje para las diferentes citocinas.
3. Analizar el perfil de citocinas características de las respuestas tipo Th1, Th2 y Th3 en placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos a diferentes tiempos de la infección por rotavirus en el ratón, por medio del análisis del RNA mensajero.
4. Correlacionar el perfil de citocinas encontrado con los isotipos de inmunoglobulinas como producto de la infección, inducidas en suero y en los órganos linfoides.

5. Metodología

5.1. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados en los experimentos descritos en este trabajo, así como sus suplementos fueron obtenidos de GIBCO BRL. Estos fueron preparados en agua ultrapura, ajustando el pH según los requerimientos. Posteriormente, se esterilizaron por filtración a través de una membrana de 0.22 μm y suplementaron como se describe a continuación:

- a) MEM⁺: Preparado con 2 g/lit de bicarbonato de sodio y ajustando el pH a 7.0. Suplementado con 8% de suero fetal bovino (SFB), 2mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina.
- b) MEM⁻: Preparado igual que el MEM⁺, pero sin adicionar SFB.
- c) RPMI⁺: RPMI 1640 preparado con 2 g/lit de bicarbonato de sodio y ajustando el pH a 6.8. Suplementado con 10% con SFB, 10 $\mu\text{g/ml}$ de Gentamicina, 2mM de L-glutamina, 5X10⁻⁵M 2-mercaptoetanol (2-ME) y 10mM de Ácido N-2-hidroxietilpiperazida-N'-2-etanosulfónico (Hepes).
- d) RPMI⁻: Preparado igual que el RPMI⁺, pero sin adicionar SFB.

5.2. Líneas celulares:

MA-104: Línea de células epiteliales de riñón fetal de mono Rhesus. Mantenido en MEM⁺ y sembradas cada tercer día por medio de la técnica de tripsinización. Para esto, se retira el medio de cultivo y la monocapa celular se lava dos veces con PBS (pH 7.0) sin calcio y sin magnesio y se adicionan de 1 a 2 ml de una solución de tripsina (Sigma) en PBS más EDTA. Después de 5 min a 37 °C, las células despegadas son resuspendidas en MEM⁺ (para que el SFB neutralice la actividad de la tripsina) y sembradas en medio fresco a una proporción de 1 volumen de la suspensión celular por 9 volúmenes de medio.

5.3. Cepas virales:

Se utilizó el rotavirus murino silvestre EDIM (Mu/G3P10[16]), donado gentilmente por el Dr. Richard L. Ward (J. N. Gamble Institute of Medical Research, Ohio, USA), que proviene de homogeneizados intestinales de ratones infectados con el virus, a una concentración de 10⁸ unidades formadoras de focos(uff)/ml en MEM⁻.

Los rotavirus RRV (Si/G3P5[3]) de simio, adaptados a crecer en cultivo celular, fueron expandidos en células MA-104, como se indica más adelante.

El virus vaccinia (CR19), donado gentilmente por el Dr. Bernard Moss (LVD, NIAID, NIH, Bethesda, MD), se utilizó a una concentración de 4X10⁷ unidades formadoras de placas (ufp)/ml en PBS.

a) Expansión viral:

Se cultivaron células MA-104 hasta confluencia en frascos de 162 cm² a 37° C en una incubadora con atmósfera humidificada y 5% de CO₂/95% de Aire. Los frascos conteniendo las células en monocapa se lavaron 2 veces con MEM, para eliminar el suero. Las células fueron infectadas con los rotavirus RRV o YM tratados previamente durante 30 minutos a 37°C con 10 µg/ml de tripsina. El efecto citopático fue observado a las 18-24 hrs. posteriores a la infección y los lisados celulares fueron colectados y congelados a -20°C [65].

b) Semipurificación viral por colchón de sacarosa:

Con la finalidad de liberar las partículas virales aun atrapadas, los lisados de las células infectadas fueron congelados y descongelados 2 veces y sometidos a agitación vigorosa durante 10 minutos con un volumen igual de triclorofluoroetano (Freon, MERCK). La mezcla resultante fue centrifugada a 7,000rpm durante 30min a 4°C para eliminar los restos celulares. Así las partículas virales semipurificadas contenidas en los sobrenadantes fueron colectadas y concentradas por ultracentrifugación a 25,000 rpm durante 2.5 horas a 4°C. El pellet obtenido fue resuspendido en buffer TSC (10mM Tris, 100mM NaCl, 10mM CaCl, pH 7.4), pasado a través de un colchón de sacarosa al 30% peso/vol y ultracentrifugado durante 45 min. a 65,000 rpm a 4°C, en un rotor SW50. La pastilla insoluble resultante fue suspendida en 500 µl de TSC, alicuotada en tubos Eppendorf y almacenadas hasta su uso a 70°C. El producto viral fue evaluado cualitativamente por electroforesis en geles de poliacrilamida y cuantitativamente por el método de Lowry respectivamente.

c) Determinación de proteínas por el método de Lowry

El virus se disgregó hirviendo las muestras en buffer disruptor (SDS 5% en TSC) durante 3 minutos. En una placa de 96 pozos fueron cargadas 20 µl de las muestras a diferentes diluciones en TSC, utilizando como control concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA, SIGMA). Se adicionaron a cada una de las diluciones 25 µl de la Solución A y 200 µl de la solución B (BIO RAD). Se desarrolló la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente y se tomó la lectura de las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 630nm. Se estandarizó gráficamente la curva de concentraciones para la proteína BSA y se tomó como base para conocer la concentración de las proteínas virales.

d) Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para determinar la pureza de las preparaciones virales, estas fueron analizadas mediante el sistema de Laemmli, que consiste en someter a las muestras y el marcador de peso molecular preteñido previamente hervidos en buffer de carga (1%SDS, 1% 2-ME, 2mM EDTA, 10% glicerol, 50mM Tris, pH 6.8) a electroforesis durante 2hrs a 200V en geles de poliacrilamida al 11% en condiciones

desnaturalizantes (1%SDS). Los geles resultantes fueron teñidos 30 min. en azul brillante de Coomassie al 0.05% en una solución metanol 50% y ácido acético 10% en agua, y posteriormente fueron desteñidos durante 4 hrs. en una solución de metanol 40% y ácido acético 7% en agua.

5.4. Ratonos e infección:

Los experimentos se llevaron a cabo con ratones hembras de la cepa singénica BALB/c (H-2^d) de 6-8 semanas de nacidos, libres de rotavirus (determinado serológicamente mediante ensayos de ELISA) provenientes de los Bioterios del Instituto de Biotecnología de la UNAM y del Instituto Nacional de Salud Pública. Estos fueron separados en cajas de aislamiento en grupos de 3 a 5 ratones, e inoculados oralmente con 100 µl de bicarbonato de sodio al 1.33 % p/v en agua destilada, y posteriormente por la misma vía se les administró 100 µl del rotavirus EDIM (10⁴ uff/ratón) diluido en MEM⁻. Los ratones control fueron inoculados con 100 µl de MEM⁻ solo.

Diariamente se obtuvieron muestras de heces de los ratones durante la infección viral hasta el día 8 y al día 21, así como antes de ser infectados para el control. Así mismo, se tomaron muestras de sangre de las que se separó el suero. Las muestras de heces y sueros fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Cada dos días y hasta el 8° día posterior a la infección, se sacrificó un grupo de ratones de los cuales se extrajeron placas de Peyer, ganglios linfáticos mesentéricos y bazo, y se guardaron los tejidos a -70° C hasta su uso.

En otros experimentos, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical en grupos a los días 0, 2, 5 y 7 posteriores a la infección y se aislaron las placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos, de donde se obtuvieron las células de dichos órganos.

En los experimentos con el virus vaccinia, grupos de 2 ratones cada uno fueron infectados intraperitonealmente (i.p.) con 0.5 ml del virus vaccinia (2X10⁷ ufp/ratón), a excepción de los del grupo control a los que les fueron administrados 0.5 ml de PBS. Los ratones fueron sacrificados por grupo a los días 0, 1, 2 y 3 posteriores a la infección y se aisló el bazo con el fin de obtener las células del mismo.

5.5. Extracción de células de órganos.

Los diferentes órganos fueron disgregados en RPMI⁺ por presión a través de una rejilla metálica con un émbolo de jeringa. De esta suspensión se aislaron las células mediante centrifugación a 2,000 rpm durante 5 min. y se resuspendieron en 3 ml de RPMI⁺. Las células se cuantificaron y alicuotaron por duplicado en tubos Eppendorf libres de RNasas (horneados a 180°C) de 1.5 a 2X10⁷ células/tubo. Estos fueron centrifugados y el medio de cultivo fue eliminado para la preservación celular por congelación.

Las células de bazo fueron previamente tratadas con NH_4Cl 0.15 M en PBS durante 5 min. a temperatura ambiente y lavadas 2 veces con RPMI. Posteriormente fueron cuantificadas y alicuotadas como se describió con anterioridad.

a) Estimulación de células de órganos con concanavalina-A (Con-A):

Células de los órganos de ratones no infectados fueron sembradas en frascos de 75 cm^2 (Costar) a 10^6 células/ml en 30 ml RPMI⁺ con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Con-A y se incubaron durante 24 horas a 37° C una incubadora con atmósfera humidificada y 5% de CO_2 y 95% de aire. Los blastos fueron colectados distribuyéndose en tubos Eppendorf libres de RNasas a 1×10^7 células/tubo, se eliminó el medio y se congelaron a -70° C hasta su uso (Con-A 24h). El RNA de estos linfocitos activados fue utilizado como control positivo para la determinación del mensaje para las diferentes citocinas en las reacciones de RT-PCR, como se describe a continuación.

5.6. Extracción de RNA

A partir de los órganos y las células se aisló el RNA total por el método de tiocianato de guanidina/fenol:cloroformo [64]. Para la extracción se utilizaron las siguientes soluciones:

- a) H_2O -DEPC: a 1 litro de agua se le añadió 1 ml de Dietilpirocarbonato (DEPC, SIGMA) y se dejó reposar 12 horas previo a su esterilización por autoclave.
- b) Solución stock de tiocianato de guanidina (Duración: 3 meses a T.A.): Pesár con espátula horneada y limpia: 50 gr. de tiocianato de guanidina, agregar 58.6ml de DEPC- H_2O , 3.52 ml de 0.75M de citrato de sodio y 5.28 ml de sarcosyl 10%. La solución fue transferida a un recipiente ámbar.
- c) Fenol saturado con DEPC- H_2O : Se fundieron 100 gr. de fenol en un baño maría a 65 °C en la campana de extracción y se agregaron 100 ml de DEPC- H_2O se mezcló hasta formar una emulsión, misma que se deja reposar durante la noche a 4°C, después se elimina la fase acuosa dejando solo una pequeña capa que cubra al fenol. La solución se mantiene a 4° el frasco ámbar exclusivo para utilizar con RNA.

Los diferentes órganos y/o células fueron homogeneizados en presencia de 500 μl de Solución D preparada el mismo día (5 ml Solución Stock de Tiocianato de Guanidina y de 36 μl de 2-ME). Enseguida se añadieron 50 μl de Acetato de Sodio 2M, pH 4.0, 550 μl de Fenol saturado y 200 μl de Cloroformo: Alcohol Isoamílico (49:1). Los tubos se agitaron por inversión durante 10 segundos y se centrifugaron durante 10min a 15,000rpm a 4° C. Se extrajo la capa superior (que contiene el RNA) que se transfirió a tubos nuevos y horneados. Al extracto se le añadió un volumen equivalente de Isopropanol (para precipitar el RNA). Esta mezcla se guardó durante toda la noche a -20°C. Posteriormente se centrifugó durante 10 min. a 15,000 rpm; 4° C. El líquido fue decantado y la pastilla obtenida se disolvió en 166 μl de solución D. Para precipitar

nuevamente el RNA se agregó un volumen igual de isopropanol (-20°C) y la mezcla obtenida se mantuvo a -20°C por lo menos durante 1 hora. Se centrifugó durante 10 min.; 15,000 rpm; 4°C . El líquido fue decantado y la pastilla se lavó con 1 ml de Etanol al 75% en H_2O -DEPC. Se centrifugó 10 min; 15,000 rpm; 4°C . y se decantó el sobrenadante. La pastilla se secó al aire y se resuspendió en 15-20 μl de H_2O -DEPC. Para solubilizar completamente el RNA, se calentaron los tubos en un baño maría a 65°C durante 5 min. Para cuantificar y determinar la pureza del RNA obtenido se midió su absorbancia a 260 y 280 nm respectivamente en un Espectrofotómetro Beckman.

La calidad del RNA fue analizada mediante la electroforesis de $2\mu\text{g}$ de cada una de las muestras en un gel de agarosa al 1% bajo condiciones desnaturalizantes como se describe a continuación:

La cámara de electroforesis se lavó con detergente Extran, y se enjuagó con H_2O destilada. Posteriormente se lavó con etanol y dejó secar al aire por varios minutos. Se lavó nuevamente con H_2O_2 3% y se dejó secar por 10 minutos y se enjuagó con H_2O - DEPC y se dejó secar totalmente.

A 500 mg de agarosa se le agregaron 31.1 ml de H_2O -DEPC, y se calentó en horno de microondas hasta solubilizar completamente. Se dejó enfriar hasta alcanzar los 60°C y se le agregaron: 10 ml de buffer de corrida 5X (MOPS 0.1M, Acetato de Sodio 40mM, EDTA 5mM), y 8.9 ml de formaldehído, y se decantó en la cámara de electroforesis y se dejó solidificar por 30 min. a T/A. Una vez solidificada la agarosa, la cámara se dejó enfriar a 4°C por 30 min. al igual 250 ml de buffer de corrida (50 ml de 5X running buffer, 44.8 ml de formaldehído en H_2O - DEPC.)

Se tomaron $2\mu\text{g}$ de cada una las muestras de RNA se llevaron a un volumen final de $5\mu\text{l}$, a los que se les agregó $9.6\mu\text{l}$ de mezcla de formamida (200 μl buffer de corrida 5X, 350 μl formaldehído y 1 ml de formamida). La mezcla incubó a 65°C por 15 min para desnaturalizar el RNA. Las muestras se enfriaron en hielo durante 2 min. Y se centrifugaron por 30", posteriormente se les añadió 2 μl de buffer de muestra a cada una de las muestras y se cargaron en el gel, que ya había sido precorrido durante 5 min. a 70 V. Una vez cargadas las muestras en el gel, este se sometió a un voltaje de 100 V hasta que el frente alcance 8 cm. El gel se retiró y se tiñó en bromuro de etidio y se lavó con H_2O toda la noche. Se visualizó a través de luz U.V.

5.7. Síntesis de primers:

Las secuencias de los pares de primers para la amplificación del cDNA de ratón para β -actina, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TGF- β 1 e IL-12p40 han sido descritas anteriormente [54,61,66].

La síntesis de los primers antes mencionados, así como el oligo dT₁₅, fue realizada en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, utilizando el método del fosfito-triester en fase sólida.

La secuencia de los primers, así como la longitud del producto de amplificación en relación al número de pares de bases, se describe en la siguiente tabla.

Tabla 1. Pares de primers utilizados para la amplificación del cDNA para determinar mensaje para citocinas

Citocina	Primer Sentido	Primer Antisentido	Amplifica
β -actina	ATG GAT GAC GAT ATC GCT	ATG AGG TAG TCT GTC AGG T	550 pb
IL-2	AAC AGC GCA CCC ACT TCA A	TTG AGA TGA TGC TTT GAC A	442 pb
IL-4	TAG TTG TCA TCC TGC TCT T	CTA CGA GTA ATC CAT TTG C	404 pb
IL-5	AAG GAT GCT TCT GCA CTT GA	ACA CCA AGG AAC TCT TGC A	365 pb
IL-10	AAC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA	CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A	237 pb
INF- γ	TGA ACG CTA CAC ACT GCA TCT TGG	CGA CTC CTT TTC CGC TCC CTG AG	460 pb
TGF- β 1	CCT CCC CCA TGC CGC CCT CG	CCA GGA ATT GTT GCT ATA TTT CTG	545 pb
IL-12 p40	CAG TAC ACG TGC CAC AAA GGA	GTG TGA CCT TCT CTG CAG ACA	273 pb

5.8. Transcripción Reversa (RT)

Se realizaron reacciones de 20 μ l que contenían 1X Buffer de primera hebra (Gibco) (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl), 10 mM DTT (Boehringer-Mannheim), 3 mM MgCl₂, 1mM de dGTP, dATP, dTTP y dCTP (Gibco), 5.2 mM de oligo dT₁₅, 20 U de inhibidor de RNAsas (Boehringer-Mannheim), 200 U de la enzima M-MLV RT (Gibco) y 10 o 2.5 μ g (obtenido de órgano o células respectivamente) del RNA total desnaturalizado durante 5 minutos a 65° C.

Las reacciones fueron cubiertas con 16 μ l de aceite de silicón e incubadas durante 10 minutos a Temperatura ambiente, 1 hora a 37° C, y 10 minutos a 95° C en un termociclador Techne, modelo PHC-2. Al término de la reacción, las muestras de cDNA obtenidas durante este proceso fueron almacenadas a -20° C hasta su uso.

5.9. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

De los cDNAs obtenidos en la Reacciones de RT, se tomaron 2 μ l de cada una de las muestras fueron desnaturalizadas a 94° C durante 1'15" y posteriormente se mezclaron con buffer de reacción de PCR (10 mM Tris·HCl, 50 mM KCl, 1 mM o 1.5mM MgCl₂)(Tabla 2), 0.2 mM dNTPS, 2 μ M de los primers utilizados, 0.5 U de la enzima Taq DNA polimerasa (Boehringer-Mannheim). Finalmente las mezclas fueron cubiertas con aceite de silicón y se incubaron durante 30 ciclos en un termociclador bajo las siguientes condiciones:

- a) Desnaturalización, 45 segundos a 92° C.
- b) Alineación, 1 minuto a 62° C, y
- c) Extensión 1 minuto 45 segundos a 72° C.

Amplificación del cDNA para:	Concentración final de MgCl ₂
β -actina, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, INF- γ , IL-12 p40	1.5 mM
TGF- β 1	1.0 mM

Tabla 2. Concentración final de Magnesio requerido para la amplificación del cDNA para citocinas en las reacciones de PCR.

Los productos fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6%, el cual fue teñido en una solución de Bromuro de Etidio a 0.25 μ g/ml durante 5' y las bandas resultantes fueron visualizadas y fotografiadas mediante la exposición del gel a través de luz UV para su análisis.

a) Cuantificación de las bandas obtenidas de los ensayos de PCR.

Las fotografías tomadas de los geles de PCR ante la exposición de luz U.V., fueron analizadas utilizando el programa NIH-Image, y las densidades de banda obtenidas en la amplificación de los mensajes para las citocinas fueron comparadas y graficadas con relación a las bandas del gen constitutivo (β -actina).

5.10. Detección de rotavirus y anticuerpos específicos contra rotavirus.

Se colectaron las heces de los ratones durante un periodo de 8 días de infección, éstas fueron congeladas a -20° C hasta su uso. Posteriormente fueron resuspendidas al 10% (peso/volumen) en el siguiente buffer: 10mM Tris, 100mM NaCl, 1mM CaCl₂ (pH 7.4), 5% suero fetal de bovino, 0.05% Tween-20, 10 mM azida de sodio.

Tanto la excreción de rotavirus en heces como los anticuerpos IgA intestinales contra rotavirus se evaluaron por ensayos de ELISA de captura a partir de la suspensión de las heces, como ha sido descrito previamente (Franco y Greenberg, 1995) [23]

a) Determinación de antígeno viral en heces:

Placas de 96 pozos de policloruro de vinilo (COSTAR, high binding) de fondo cóncavo fueron cargadas con 50 µl de un anticuerpo policlonal de Cabra α rotavirus (generado contra diferentes serotipos de rotavirus en el laboratorio) 1/5000 en PBS/ 0.02% azida de sodio incubadas a 4° C toda la noche. Las placas fueron lavadas 2 veces con Buffer de lavado TNC (10mM Tris, 100mM NaCl, 1mM CaCl₂, 0.05% Tween 20) y bloqueadas durante 2 horas a temperatura ambiente (TA) con leche Carnation descremada al 5% en buffer TNC (Buffer de bloqueo). Posteriormente, se lavaron las placas 4 veces y se incubaron durante 2 horas a 37° C con 50µl de los sobrenadantes de la suspensión de heces por duplicado. Después de 4 lavados se incubaron durante 1 hora a 37° C con anticuerpo policlonal de conejo α-rotavirus YM 1/1500 en buffer de bloqueo. Las placas se lavaron 4 veces y se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra α-IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina 1/2000 (Zymed) en buffer de bloqueo a 37° C durante 1 hora. Las placas fueron lavadas 4 veces y se reveló la reacción añadiendo 50 µl del sustrato (50 µl p-nitrofenil fosfato 100X (PNP) en 5 ml buffer de dietanolamina (DAE: Dietanolamina 1%, 1mM MgCl, 0.029% Azida de Sodio, pH9.8) e incubando a 37° C durante 30 minutos. La absorbancia de los pozos fue leída en un lector de ELISAs Beckman a una longitud de onda de 405 nm.

b) Determinación de Anticuerpos tipo IgA rotavirus específicos:

Las placas fueron incubadas a 4° C durante la noche con 50 µl/pozo de anticuerpo policlonal de Cabra α-rotavirus 1/5000 en PBS/ 0.02% azida de sodio. Estas fueron bloqueadas de la misma manera que el método antes descrito. Posteriormente se lavaron las placas 2 veces y se incubaron durante 2 horas a 37° C con 50µl/pozo de un lisado celular con rotavirus RRV o YM en MEM⁺. Después de 4 lavados se incubaron durante 1 hora a 37° C con 50 µl los sobrenadantes de la suspensión de heces. Las placas se lavaron 4 veces y se incubaron con 50 µl/pozo del anticuerpo conejo α-IgA de ratón marcado con Peroxidasa 1/2000 (Zimed) en buffer de bloqueo a 37° C durante 1 hora. Las placas fueron lavadas 4 veces y se desarrolló la reacción añadiendo 50 µl del sustrato (Buffer de Citratos-Fosfatos, 0.33 mg/ml o-fenildiendiamida y 1/500 H₂O₂) incubando por aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente hasta el desarrollo de la coloración y posteriormente se detuvo la reacción la placa con 50 µl/pozo de H₂SO₄ 2M. La absorbancia de los pozos fue leída en un lector de ELISAs Beckman a una longitud de onda de 492 nm.

c) Detección de anticuerpos Ig's totales específicos para rotavirus en suero.

Previo a la infección y durante la misma, a todos los grupos de ratones les fueron tomadas muestras de sangre, estas fueron puestas a 4°C toda la noche y el paquete celular fue separado del suero por centrifugación a 2,000 rpm durante 15 min. Los sueros fueron almacenados a -20° C hasta su uso. La presencia de anticuerpos antirotavirus fue determinada por un sistema de ELISA directo descrito previamente por Feng et al., 1994 [61]. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37° C con 200 ng del virus RRV semipurificado por pozo en 50 µl PBS. Se lavaron los pozos 2 veces con PBS/Tween20 (14 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1.46 mM KH₂PO₄, Na₂HPO₄ 12.1 mM; pH 7.2, 1.33 mM CaCl₂, 1.67mM MgCl₂ y 0.05% Tween 20) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con Buffer de bloqueo (PBS/SFB 5%/azida de sodio 0.02%). Las placas se lavaron 2 veces y a cada pozo se le adicionó 50 µl del suero, de manera individual, a una dilución 1/200 en buffer de bloqueo y se incubaron a 4° C durante la noche. Se lavaron 4 veces y se incubaron a 37° C durante 1 hr con 50 µl de anticuerpo policlonal rata α-ratón IgG+IgA+IgM(H+L) marcado con Peroxidasa (ZYMED) 1/5000 en buffer de bloqueo. Las placas fueron lavadas 4 veces y se desarrolló la reacción durante 10 minutos a T.A. añadiendo 50 µl de sustrato correspondiente y la reacción se bloqueó con 50 ml de H₂SO₄ 2M. La absorbancia de los pozos fue leída en un lector de ELISAs Beckman a una longitud de onda de 492 nm.

5.11. Producción de Anticuerpos específicos para rotavirus a partir de células de órganos de ratones infectados cultivadas in vitro.

Grupos de 5 ratones cada uno fueron infectados con rotavirus EDIMwt y sacrificados a los días 0, 2, 5 y 7 postinfección. Las células de placas de Peyer, ganglios linfáticos mesentéricos y bazo fueron aisladas como se describió anteriormente. De la suspensión celular resultante de cada órgano, se sembraron por duplicado 5X10⁶ células por pozo en placas Costar de 24 pozos de fondo plano a 37° C durante 48 horas a un volumen final de 1 ml en RPMI⁺. Los sobrenadantes celulares fueron alicuotados y guardados a -70° C hasta su uso.

Como un control para los días 5 y 7, se sembraron las células aislada de cada uno de los organos cómo se describió anteriormente en presencia de Con-A (2.5µg/µl).

La presencia de anticuerpos IgM, IgA e IgG rotavirus específicos en los sobrenadantes celulares fue determinada mediante ensayos de ELISA como se describió anteriormente.

6. Resultados

6.1. Montaje del modelo de infección por rotavirus en ratón adulto.

a) Seguimiento del proceso infeccioso y su resolución

Durante este trabajo se utilizó el modelo de infección por rotavirus en ratones adultos que ha sido previamente descrito por Ward, R, et. al, 1990, utilizando ratones hembras de 6 a 8 semanas de nacidos de la cepa BALB/c libres de rotavirus. Esto ultimo fue determinado serológicamente mediante un ensayo de ELISA.

Los ratones fueron infectados oralmente con el rotavirus murino EDIMwt y el proceso de infección fue seguido a través de la excreción del virus en las heces mediante un sistema de ELISA de captura. En la figura 1 se muestra un experimento representativo de una serie de 7 experimentos. Se encontraron altos niveles de excreción de virus en las heces al segundo día de la infección, que se mantuvieron hasta el día 5 y comenzaron a decrecer al día 6 hasta ser indetectables al día 8 postinfección. Como se esperaba, en las heces de los ratones control sin infectar no se detectó excreción viral mediante el ensayo de ELISA.

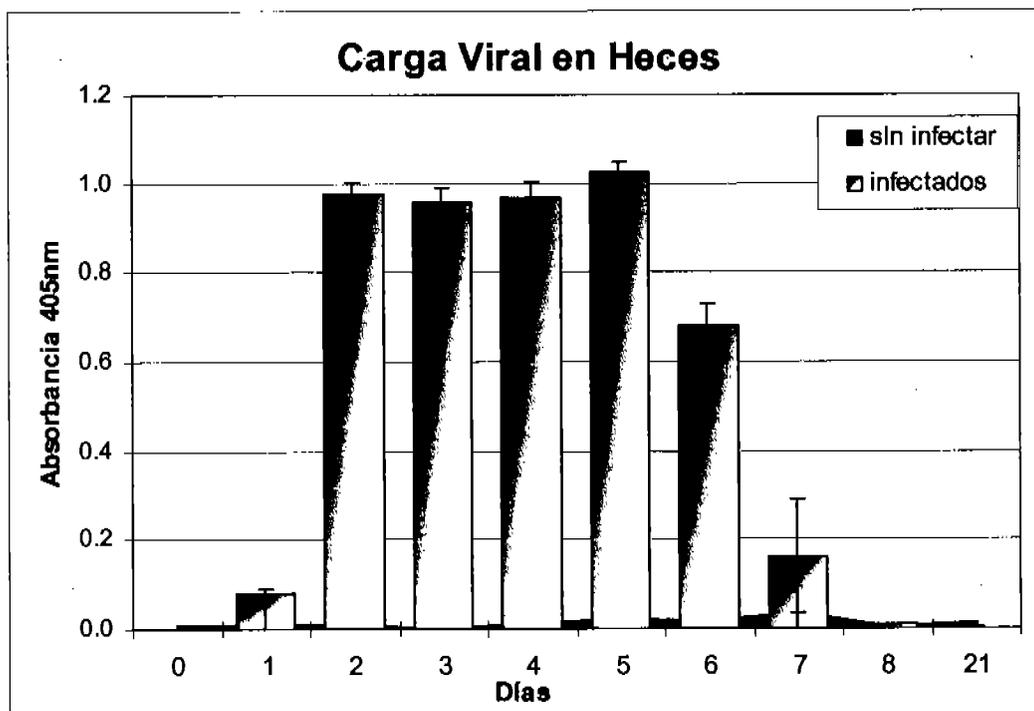


Fig.1. Muestras de heces de grupos de 4 ratones fueron analizadas por ensayos de ELISA de captura para determinar la presencia de rotavirus durante la infección.

b) *Presencia de anticuerpos IgA antirotavirus en heces:*

Para evaluar la respuesta inmune humoral a nivel de mucosa intestinal, se determinó por un ensayo de ELISA de captura la presencia de anticuerpos intestinales específicos para rotavirus del tipo IgA en las heces de los ratones infectados. En la figura 2 se muestra un experimento representativo de una serie de 7 experimentos. Los anticuerpos IgA intestinales comienzan a ser detectables al día 5, los cuales aumentan a lo largo de la infección y alcanzan un máximo al día entre los días 8 y 21 postinfección. Así mismo, en heces de ratones control no infectados no se detectaron anticuerpos IgA antirotavirus.

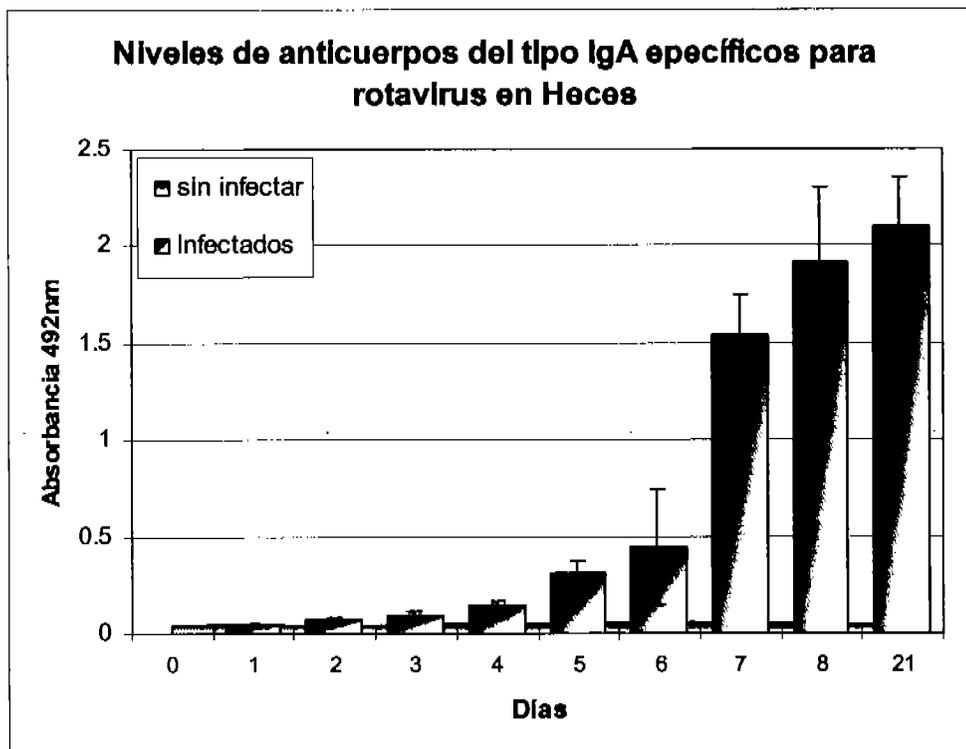


Fig. 2. - Muestras de heces de grupos de 4 ratones fueron analizadas por ensayos de ELISA de captura para la presencia de anticuerpos del tipo IgA específicos para rotavirus a lo largo de la infección. Como antígeno se usó RRV.

c) *Presencia de Anticuerpos antirotavirus en suero:*

Con la finalidad de evaluar la respuesta inmune humoral a nivel sistémico, se determinó, por un sistema de ELISA, la producción de anticuerpos séricos de los tipos IgM, IgA e IgG específicos para rotavirus de los ratones previo y durante la infección.

En la figura 3 se muestran los resultados de 3 experimentos en los que se analizaron sueros de 3 ratones en cada grupo experimental, en donde los anticuerpos IgM específicos para rotavirus se detectó la presencia de niveles bajos de estos anticuerpos en los ratones sin infectar (día 0). Posiblemente estos son anticuerpos IgM naturales presentes ubicuamente en suero, y que han sido previamente reportados [62-63]. En respuesta a la infección, se detectó un incremento notable de estos anticuerpos al día 4 postinfección, alcanzando un máximo al día 5 y manteniéndose en estos niveles al día 8. Posteriormente se observó un decremento al día 21. Finalmente, la producción de anticuerpos IgA antirotavirus fue detectada sólo hasta el día 8, con un incremento continuo al día 21. Mientras que los anticuerpos IgG son detectables al día 2 y se incrementan a lo largo de la infección hasta alcanzar un máximo al día 8, manteniéndose en estos niveles al día 21.

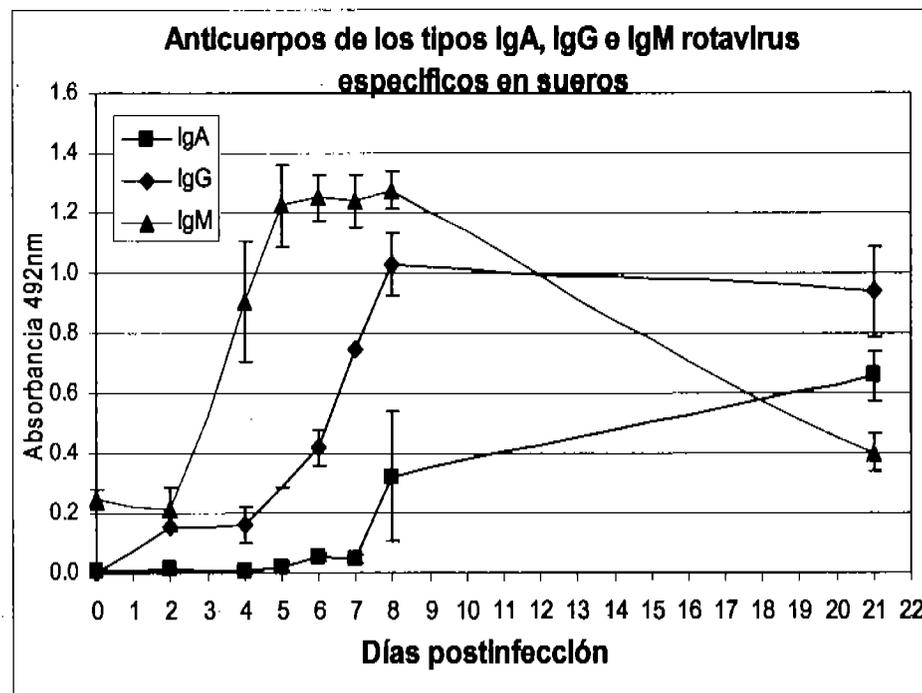


Fig. 3. Sueros de ratones (dil. 1:100) fueron analizados por ensayos de ELISA para la presencia de anticuerpos IgA(■), IgG (◆) e IgM (▲) antirotavirus a lo largo de la infección. Día 0, representa el valor promedio de los ratones sin infectar. Como antígeno se uso RRV.

Es importante señalar que los ratones utilizados en estos experimentos no presentaron anticuerpos específicos para rotavirus en suero ni en heces antes de la infección, indicándonos que los ratones no habían estado en contacto con el virus previamente. Esto garantiza que los resultados obtenidos en nuestro sistema son producto de una infección primaria por rotavirus. Así mismo, las cinéticas tanto de infección como de la respuesta inmune humoral obtenidas concuerdan con lo reportado previamente [23,67].

6.2. Amplificación del mensaje para citocinas en placas de Peyer de ratones infectados con EDIM.

Una vez reproducido el modelo de infección por rotavirus en el ratón adulto, se procedió a estudiar la respuesta de citocinas en placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos a lo largo de la infección. En todos los experimentos se evaluó la presencia del virus y de anticuerpos antirotavirus IgA en heces. Esto fue realizado con el fin de corroborar que la infección se daba de la manera esperada. Solo en aquellos experimentos donde se reprodujeron estos parámetros, se determinaron los niveles de mensaje para las citocinas.

En un inicio y basados en reportes previos de estudios de mensajes para citocinas, se procedió a extraer RNA total de placas de Peyer de cada uno los ratones infectados con EDIM. Es importante señalar que la obtención de RNA fue a partir de órgano linfóide completo, con la finalidad conocer el ambiente de citocinas en el órgano completo. Así el RNA extraído fue cuantificado y sometido a reacciones de RT (0.5µg/µl de RNA). Dos microlitros del cDNA obtenido fueron sometidos a reacciones de PCR para amplificar el mensaje para β -actina y verificar así la calidad del RNA. Los productos fueron visualizados a través de luz U.V. en geles de acrilamida sometidos a electroforesis, y una vez obtenidas las bandas para β -actina para todas las muestras, se procedió a amplificar de la misma manera el mensaje para IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ . Como control positivo se usó cDNA proveniente de blastos de linfocitos de placa de Peyer estimulados con Con-A por 24 hrs.

En la figura 4 se muestran las fotografías de un experimento representativo de 2, de las amplificaciones de los mensajes antes mencionados, encontrando que en la amplificación del mensaje para β -actina en todas las muestras se obtienen bandas relativamente homogéneas entre ellas. Contrario a esto, los resultados obtenidos mediante este proceso en la amplificación del mensaje para citocinas fueron ambiguos, debido a que la intensidad de las bandas para algunas muestras con sus duplicados no coincidían o no se amplificaba la citocina de interés. Por otro lado observamos en todos nuestros ensayos que siempre se amplificaba satisfactoriamente el mensaje para citocinas de linfocitos aislados de los órganos estimulados con Con-A, usados como control positivo.

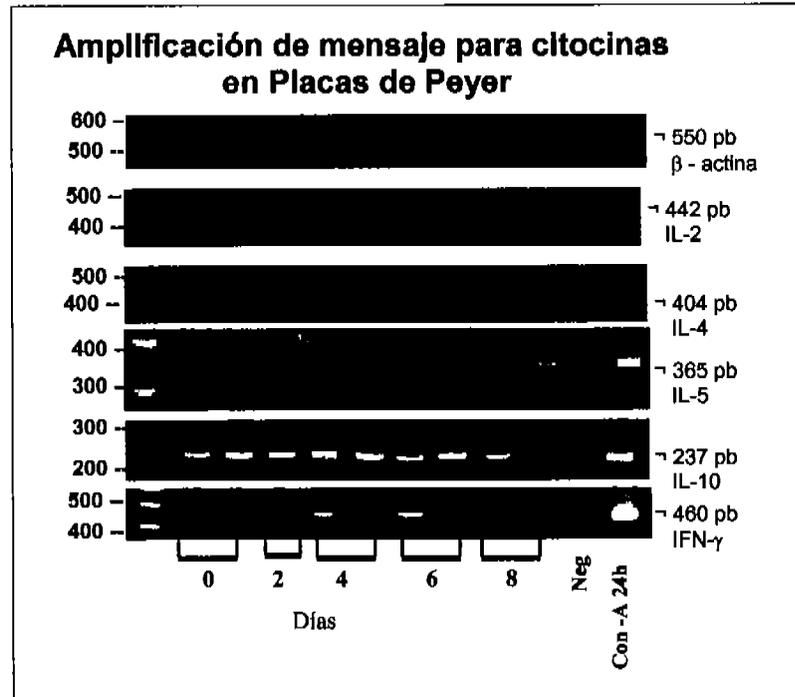


Fig. 4. RNA de Placas de Peyer fueron sometidos a reacciones de RT-PCR para la amplificación del mensaje para β -actina, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ . Una reacción de PCR sin cDNA se usó como control negativo.

Estos resultados nos sugirieron que el RNA extraído directamente de los órganos podría presentar problemas de degradación, por lo que decidimos verificar la calidad del RNA. Para esto, el RNA se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, bajo condiciones desnaturizantes. Se encontró (Fig. 5), que el RNA extraído de placas de Peyer presentaba diferentes niveles de degradación, lo cual pudiera explicar los resultados inconsistentes en la amplificación del mensajero para las diferentes citocinas. La homogeneidad en la amplificación del mensaje para β -actina pudiera deberse a los altos niveles de expresión constitutiva. En contraste, el RNA obtenido de los linfocitos activados con Con-A presentó niveles mínimos de degradación.

Independientemente de las inconsistencias en la amplificación de los RNAm para las diferentes citocinas, es claro que los mensajes para IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ , se expresan de manera constitutiva en Placas de Peyer (Fig 4, día 0)

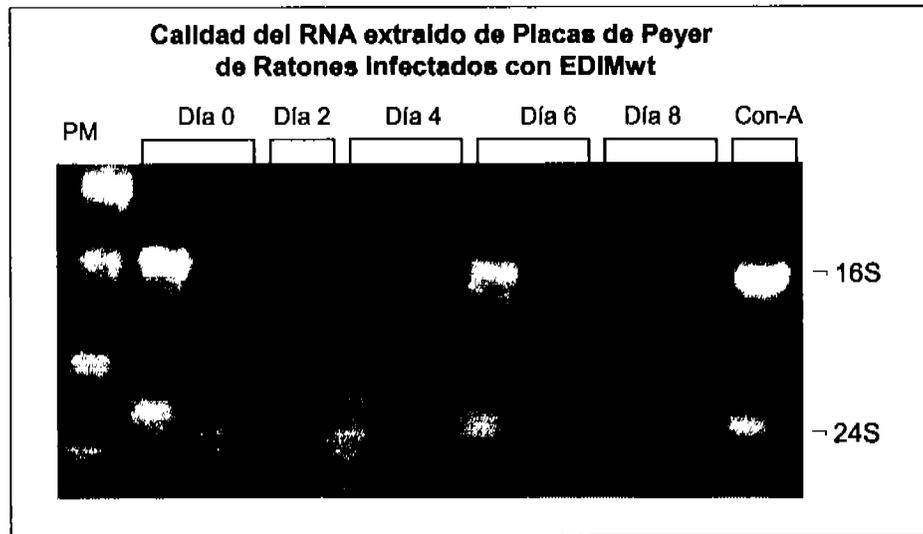


FIG. 5. 2 μ g del RNA extraído de Placas de Peyer de ratones infectados por el rotavirus EDIMwt a diferentes tiempos, fueron sometidos a electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes

Con el fin de eliminar la degradación del RNA, se determinó que en los experimentos subsecuentes se aislarían las células de los órganos linfoides a lo largo de la infección, y de estos se extraería el RNA para el análisis de mensaje por RT-PCR.

Así mismo, se decidió determinar la cantidad de RNA óptimo para la amplificación de mensaje para la β -actina y las citocinas, ya que se observó que a pesar de haber estado degradado el RNA, se amplificó satisfactoriamente el mensaje para β -actina, debido al exceso de RNA utilizado en las reacciones de RT-PCR, ocasionando la saturación del sistema cuando el RNA se encuentra en buen estado.

6.3 Montaje de las condiciones experimentales para el aislamiento y amplificación del RNA

a) Determinación de la calidad del RNA extraído de las células linfoides

A lo largo de la infección por EDIM, se aislaron las células linfoides de PP y GLM. De estas células se extrajo RNA total por el método antes descrito, se cuantificó y se sometió a electroforesis para determinar su integridad. En la Fig. 6 se muestra un experimento representativo de la electroforesis del RNA, donde se observa que la calidad de RNA extraído de células aisladas es mejor que la del órgano total (Fig. 5), lo que sugiere que al extraer el RNA por este método del órgano completo, no se inhibe totalmente la actividad de las RNAsas.

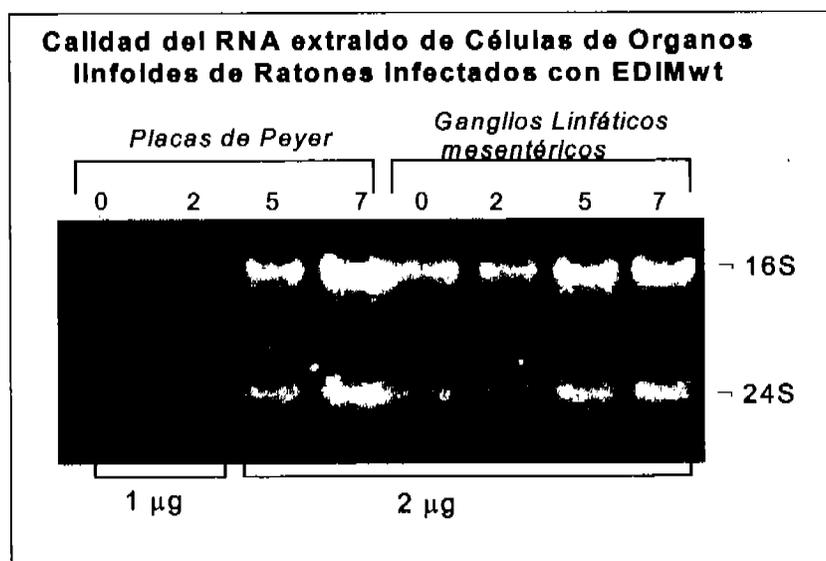


Fig. 6.- Electroforesis de RNA extraído de células aisladas de PP y GLM de ratones infectados por el rotavirus EDIMwt a diferentes días.

Una vez comprobado el estado del RNA extraído de las células, se procedió a determinar la cantidad de RNA óptimo para realizar las reacciones de RT-PCR, en la amplificación del mensaje para la β -actina y las diferentes citocinas.

b) Determinación de la cantidad óptima de RNA necesaria en las reacciones de RT-PCR

La cantidad óptima de RNA total para las reacciones de RT-PCR fue evaluada usando RNA de linfocitos provenientes de PP de ratones normales estimulados in vitro con Con-A por 24 hrs. Se decidió amplificar los mensajes para β -actina, IL-10 e IFN- γ para estandarizar las condiciones de amplificación. De esta manera, se tomaron 2.5 µg de RNA por cada reacción de RT (Vol. Final 25µl) y se realizaron reacciones de PCR para amplificar el mensaje para β -actina, IL-10 e IFN- γ , usando 2 y 4 µl de la reacción de RT con el fin de comparar la intensidad de las bandas de las reacciones. Las condiciones de amplificación fueron: 30 ciclos y 2 µl del producto de reacción de la RT.

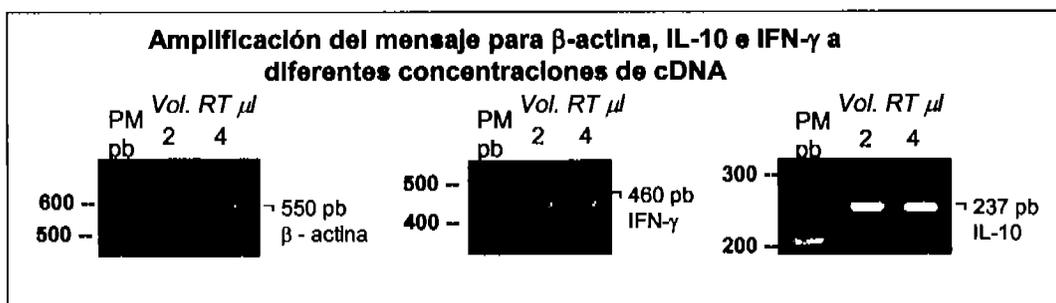


Fig. 7.- Diferentes concentraciones de cDNA (2 y 4 μ l de la reacción de RT) fueron evaluadas en la amplificación de los mensajes para β -actina, IL-10 e IFN- γ .

En la Fig. 7 se muestran los gels de la electroforesis de los productos de amplificación de los mensajes antes descritos. Dos microlitros provenientes de reacciones de RT realizadas con 2.5 μ g de RNA total (0.1 μ g/ μ l) dieron una buena señal de amplificación por PCR para los 3 diferentes mensajes evaluados. Cuando se emplearon 4 μ l de la reacción de PCR se obtuvieron señales similares para los mensajes de IL-10, IFN- γ y de β -actina indicándonos que a esas concentraciones de cDNA la reacción de PCR se encuentra en saturación. De esta manera, en nuestras condiciones, 2 μ l provenientes de la reacción de RT fue la más apropiada para las reacciones de PCR.

Para poder comparar apropiadamente las intensidades de los productos de PCR para las diferentes citocinas, fue necesario analizar la cinética de la amplificación variando los ciclos y de esta manera verificar que los productos generados con 30 ciclos no están en la fase de saturación de la reacción. Estas reacciones fueron estandarizadas con RNA obtenido de células aisladas de GLM estimuladas con Con-A durante 24 horas y usando como control células provenientes de los mismos órganos sin activar. Los RNAs fueron sometidos a reacciones de RT y los mensajes para β -actina, IL-10 e IFN- γ fueron amplificados por reacciones de PCR con un número de ciclos crecientes y los productos fueron sometidos a electroforesis. Los valores de intensidad de las bandas de amplificación de cada citocina fueron divididos entre los valores de intensidad de β -actina correspondientes, para de esta manera obtener un valor relativo ajustado.

En la Fig. 8 se muestra gráficamente la cinética de la amplificación del mensaje para β -actina. Se observó que hubo una señal de amplificación creciente de los 20 a los 30 ciclos en muestras provenientes de linfocitos activados y no activados. De los 30 a los 35 ciclos ya no hubo un aumento de la amplificación, sugiriendo la saturación de la reacción. Es importante señalar que la activación con Con-A indujo un aumento en el mensaje para β -actina, ya que a los 20 y 25 ciclos la señal de los linfocitos activados fue aproximadamente 10 % superior al control. Esto es una observación importante ya que en este trabajo el mensaje para β -actina se amplifica como un control de expresión constitutiva, que sirve como marco de referencia interno para determinar si realmente hubo

incremento de los mensajes para las diferentes citocinas como respuesta a una estimulación antigénica in vivo.

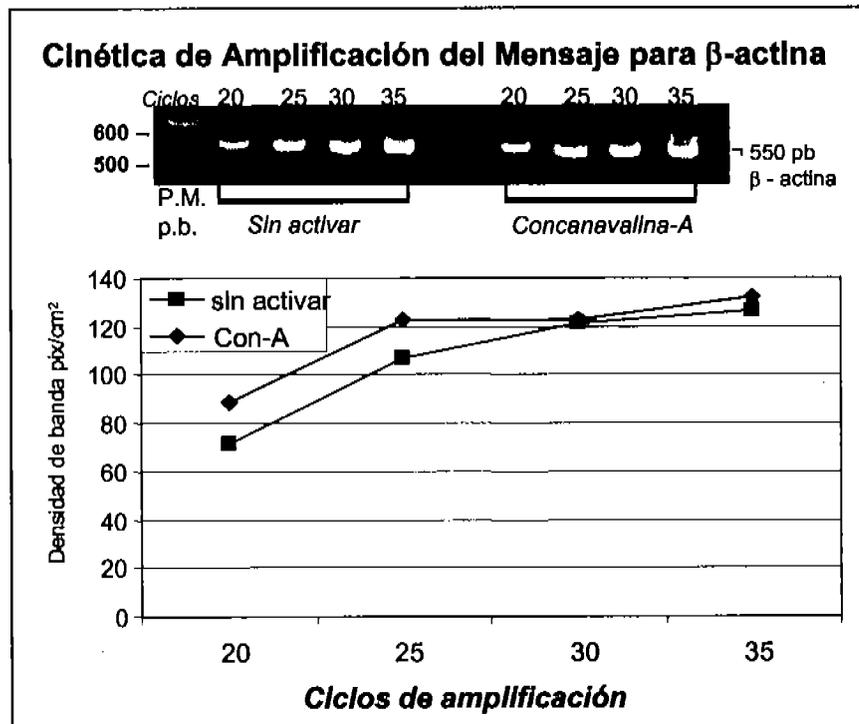


Fig. 8.- Los cDNAs obtenidos por reacciones de RT del RNA de células activadas y no activadas con Con-A, fueron sometidos a reacciones de PCR para β -actina a diferentes ciclos de reacción.

En la amplificación del mensaje para IL-10 hubo un incremento lineal de la señal de los 20 a los 30 ciclos, punto donde se alcanzó la saturación tanto para los mensajes provenientes de linfocitos activados como no activados (Fig. 9). La expresión constitutiva de esta citocina en linfocitos provenientes de GLM es bastante alta, razón por la cual no se observó un incremento en el mensaje proveniente los linfocitos activados. De esta manera, en un intento para poder determinar si realmente existió un aumento en el mensaje en los linfocitos activados, se amplificaron los cDNA's bajo las mismas condiciones experimentales pero diluyéndolos 1/5 y 1/10. Se encontró que a las dos diluciones la señal de los mensajes tanto de los linfocitos activados como no activados era similar entre los ciclos 20 y 25, punto a partir del cual se dio una amplificación lineal a los ciclos 30 y 35 sin llegar a la saturación (Fig. 10). En ambas diluciones sólo se encontró mayor amplificación del mensaje proveniente de los linfocitos activados en comparación a los no activados a los 30 ciclos, siendo ligeramente superior en la dilución 1/5.

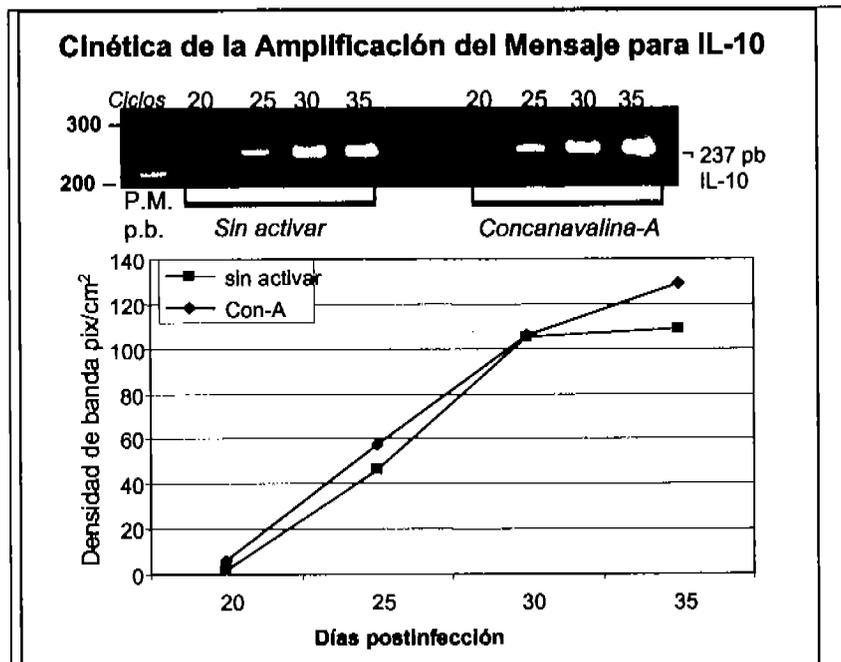


Fig. 9.- Los cDNAs obtenidos por reacciones de RT, de RNAs de células activadas y no activadas con Con-A fueron sometidos a reacciones de PCR para IL-10 a diferentes ciclos de reacción.

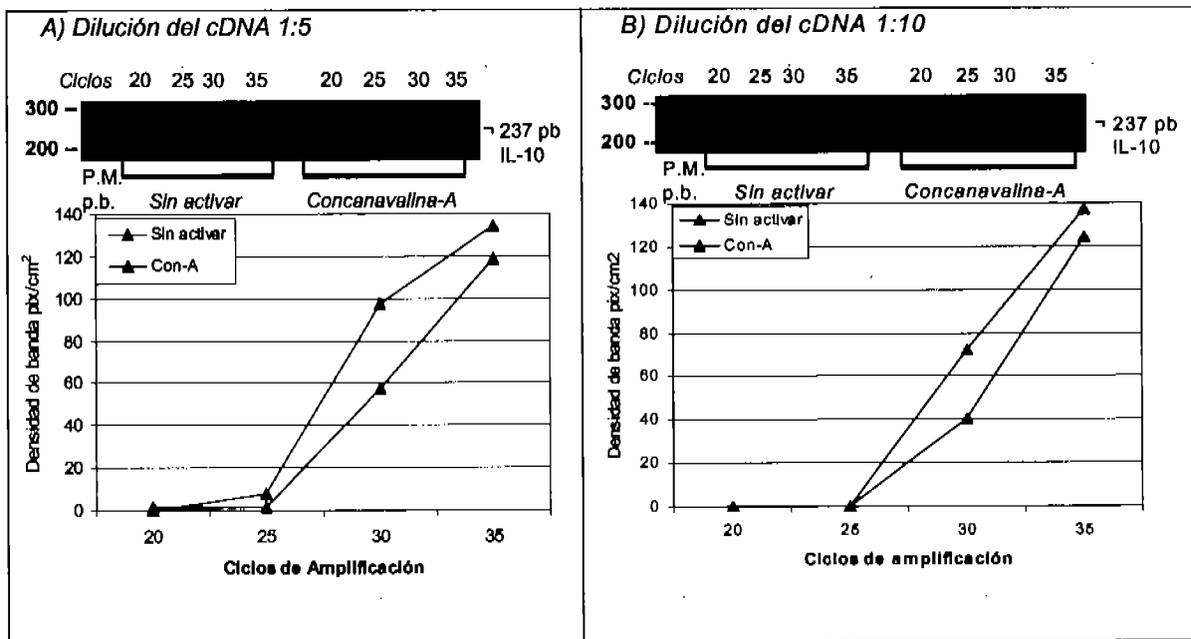


Fig. 10.- Los cDNAs obtenidos por reacciones de RT, de RNAs de células activadas y no activadas con Con-A fueron diluidos a A)1:5 y B)1:10 y sometidos a reacciones de PCR para IL-10 a diferentes ciclos de reacción.

En la Fig. 11 se muestra gráficamente la cinética de la amplificación del mensaje para IFN- γ . En esta grafica se observa que la saturación del producto se alcanza entre los 30 y 35 ciclos de PCR para los linfocitos activados con Con-A, mientras que para los linfocitos sin activar aún a los 35 ciclos no ha alcanzado la saturación total. Es por esto, que para amplificar IFN- γ , se realizaron las reacciones a 30 ciclos de PCR, ya que es en este punto donde se visualiza el aumento en la expresión del gene para IFN- γ al estimular las células con el mitógeno, en relación al los niveles constitutivos del control.

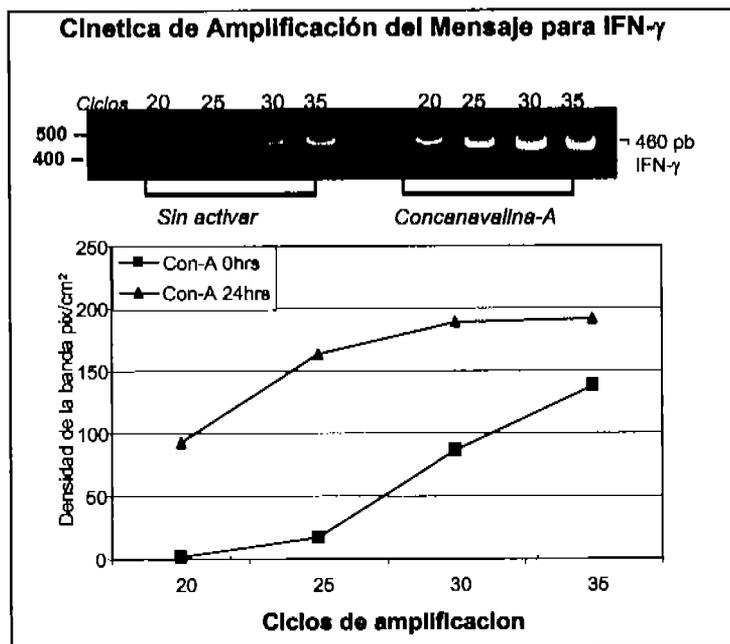


Fig. 11.- Los cDNAs obtenido por reacciones de RT, de RNAs de células activadas y no activadas con Con-A fueron sometidos a reacciones de PCR para IFN- γ a diferentes ciclos de reacción.

Con los resultados obtenidos de estos experimentos, se decidió realizar las reacciones de amplificación de los mensajes para la β -actina y las citocinas de interés a 30 ciclos de reacción de PCR para todos los casos. Así como llevar a cabo las reacciones con diluciones del cDNA solo para aquellas citocinas en las que la amplificación de los mensajeros se observara bandas saturadas desde su expresión constitutiva y que no permitiesen determinar cambios de expresión como consecuencia de la infección, tal fue el caso de los mensajes para β -actina, IL-10 y TGF- β (no mostrados).

6.4 Análisis de la respuesta inmune de células aisladas de órganos linfoides asociados a mucosa intestinal de ratones infectados con EDIM.

a) Número celular en PP, GLM y bazo en respuesta a la infección.

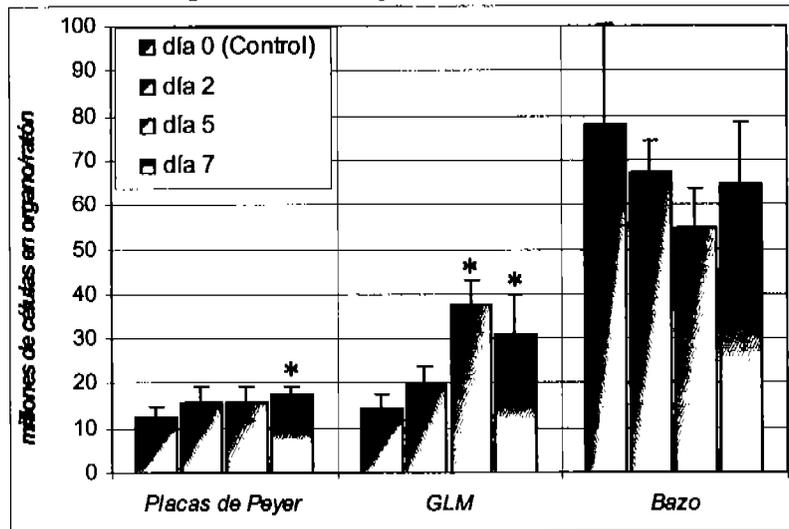
Con la finalidad de conocer la dinámica de la respuesta celular en PP y GLM de ratones infectados con rotavirus, se analizó la variación celular *in vivo* en base a diferentes tiempos de infección, como se ha reportado anteriormente [20].

Así, se aislaron PP (6 /ratón), GLM (6 /ratón) y bazo (1/2 bazo por ratón) de ratones infectados con el rotavirus EDIM a los días 0 (control), 2, 5 y 7 postinfección. Se obtuvieron las células y se cuantificaron con un hemocitómetro en presencia de azul de tripano para excluir las células muertas.

En la Fig. 12 se muestran los resultados de 3 experimentos (4 ratones por experimento) del análisis de la variación celular, así como las diferencias porcentuales de incremento celular en los diferentes órganos por ratón en comparación con el día 0 (ratones no infectados). Se encontró que en respuesta a la infección tanto en las PP como en los GLM se incrementó el número celular con respecto al control. En PP se observó un aumento del significativo del 40% al día 7. En el caso del GLM el aumento fue del 170% al día 5 y bajando a 120% al día 7 ($p \leq 6$). Estos resultados concuerdan con la hiperplasia de PP y GLM que se aprecia visualmente en los ratones infectados. A diferencia de lo anteriormente descrito, en bazo se encontró que lejos de incrementarse el número celular hubo un mantenimiento del número celular a lo largo de la infección.

Hay incremento de la población celular en PP y GLM como resultado de la infección, lo cual concuerda con reportado en estudios previos [20].

Variación del número celular en órganos linfoides en respuesta a la infección por rotavirus



Variación del número celular con respecto al control

Días postInfección	2	5	7
Placas de Peyer	+ 25 %	+ 24 %	+ 40 %
G.L.M.	+ 38 %	+ 170 %	+ 120 %
Bazo	-13 %	- 30 %	- 17 %

Fig. 12.- Las células aisladas de los órganos linfoides de los ratones infectados con EDIM a diferentes tiempos, fueron cuantificadas y graficadas para su análisis. * Indican diferencias significativas de los números celulares comparados con el control (día 0), $p \leq 0.06$ (prueba de t de Student).

6.5 Análisis del mensaje para citocinas de células aisladas de órganos linfoides asociados a mucosa intestinal de ratones infectados con EDIM.

Una vez montado el sistema de infección y estandarizadas las variables de nuestro sistema de amplificación de mensaje para las citocinas, se procedió a aislar las células de Placas de Peyer y Ganglios linfáticos mesentéricos de ratones infectados con EDIM a diferentes tiempos. De estas células se extrajo el RNA, el cual se cuantificó y se sometió a electroforesis para verificar su estado. Sólo con el RNA que se encontrara en buenas condiciones, se realizaron reacciones de RT-PCR.

a) Análisis del mensaje para citocinas en células de placas de Peyer

El RNA proveniente de células de PP fue amplificado por ensayos de RT-PCR para determinar los niveles de mensaje para β -actina, IL-2, IL-10, IL12p40, IFN- γ y TGF- β 1 a lo largo de la infección por el rotavirus EDIM. En todos los experimentos se incluyeron linfocitos de PP estimulados con Con-A como control positivo. Como control se corrió una reacción de PCR sin cDNA.

La Fig. 13 muestra gráficamente resultados de un experimento representativo de 3 y que muestra las tendencias obtenidas en la amplificación del mensaje para dichas citocinas y la β -actina. De estos experimentos se pudo determinar que el mensaje para β -actina se incrementa hasta en un 10% como consecuencia a la activación celular debido a la infección a los días 2 y 5 postinfección (Fig. 13, f). Este incremento fue tomado en cuenta para determinar los niveles de mensaje para las citocinas, en base a las densidades relativas.

Como se observó previamente en los ensayos para los órganos completos, las células provenientes de PP expresaron niveles constitutivos de mensaje para todas las citocinas previo a la infección. Siendo los mensajes constitutivos para IL-10, IL-12 y TGF- β los más altos (Fig. 13, b, c y d).

El mensaje para IL-2 tuvo un incremento a los 2 días postinfección, regresando a niveles basales al día 7 (Fig. 13, a). INF- γ también presentó un incremento al día 2 con una ligera reducción al día 5 y regresando a niveles basales al día 7 (Fig. 13, d). Por el contrario, los mensajes para la cadena p40 de IL-12 y TGF- β mostraron un ligero incremento en respuesta a la infección sólo hacia el día 7 (Fig. 13, c y e). Asimismo, el mensaje para IL-10 evidenció un incremento sólo al día 5 (Fig. 13, d). Es importante señalar que en todos los experimentos el control positivo de amplificación para todas las citocinas evaluadas (blastos de linfocitos) funcionó eficientemente, lo cual valida las reacciones de RT-PCR empleadas.

Por lo anterior, podemos decir, que aunque a diferentes niveles y con diferente cinética, la infección por rotavirus induce la síntesis de RNAm para citocinas tipo Th1 (IL-2, INF- γ e IL-12), Th2 (IL-10) y Th3 (TGF- β) en células provenientes de PP.

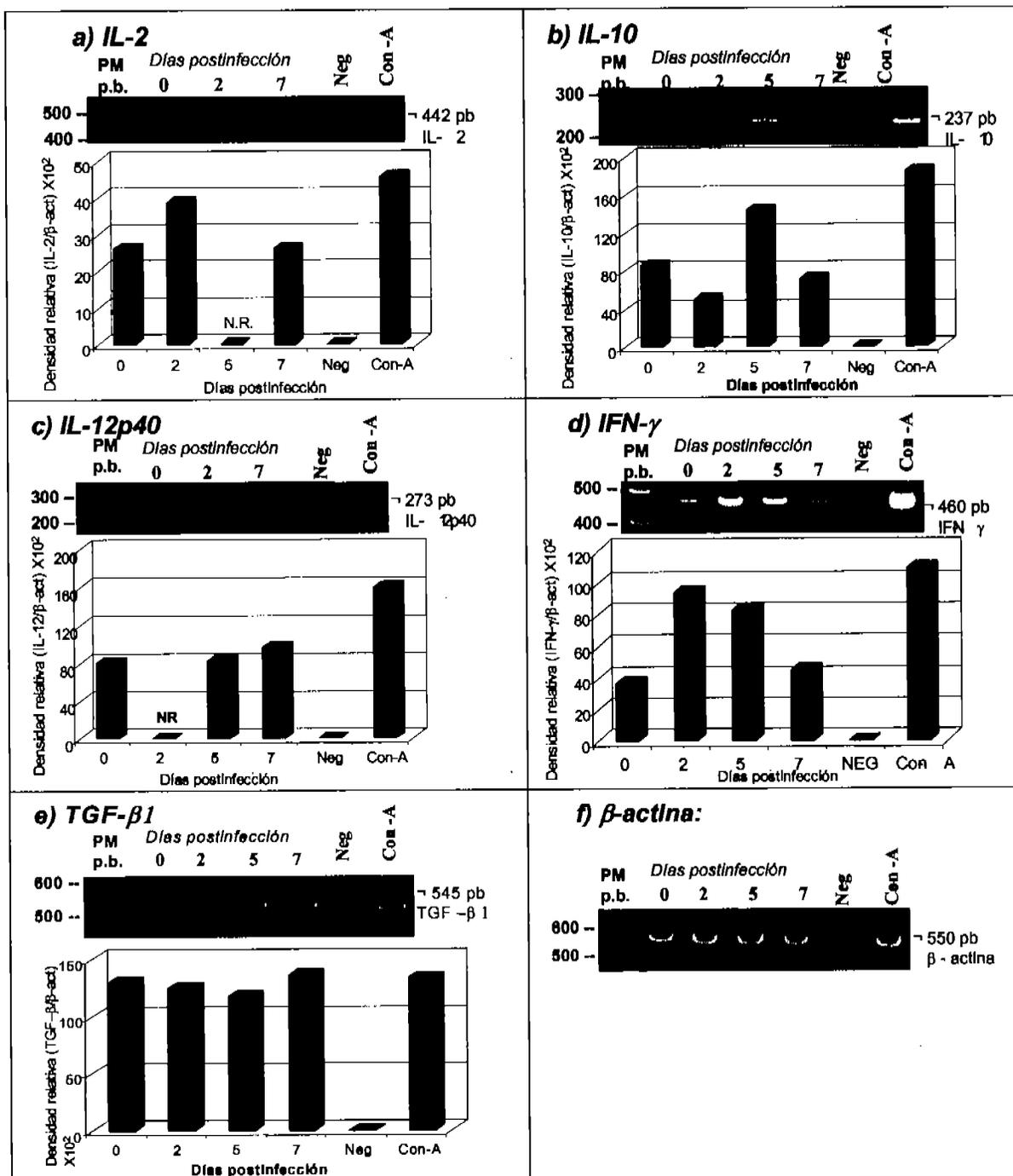


Fig. 13.- El RNA extraído de las células de las placas de Peyer de ratones infectados con rotavirus EDIM, fue sometido a reacciones de RT-PCR para amplificar el mensaje para: a)IL-2, b)IL-10 (dil. 1/10 cDNA), c)IL-12, d)IFN-γ y e) TGF-β1 (dil. 1/5 cDNA). Las densidades de banda para las citocinas fueron comparadas y graficadas con respecto a las bandas obtenidas de la amplificación de la f) β-actina. (NR= No realizado)

b) Análisis del mensaje para citocinas en células de ganglios linfáticos mesentéricos.

El RNA proveniente de células de GLM fue amplificado por ensayos de RT-PCR para determinar el mensaje para β -actina, IL-2, IL-4, IL-10, IL12p40, IFN- γ y TGF- β 1 a lo largo de la infección por el rotavirus EDIM. En todos los experimentos se incluyeron linfocitos de GLM estimulados con Con-A como control positivo. Como control de reactivos se corrió una reacción de PCR sin cDNA.

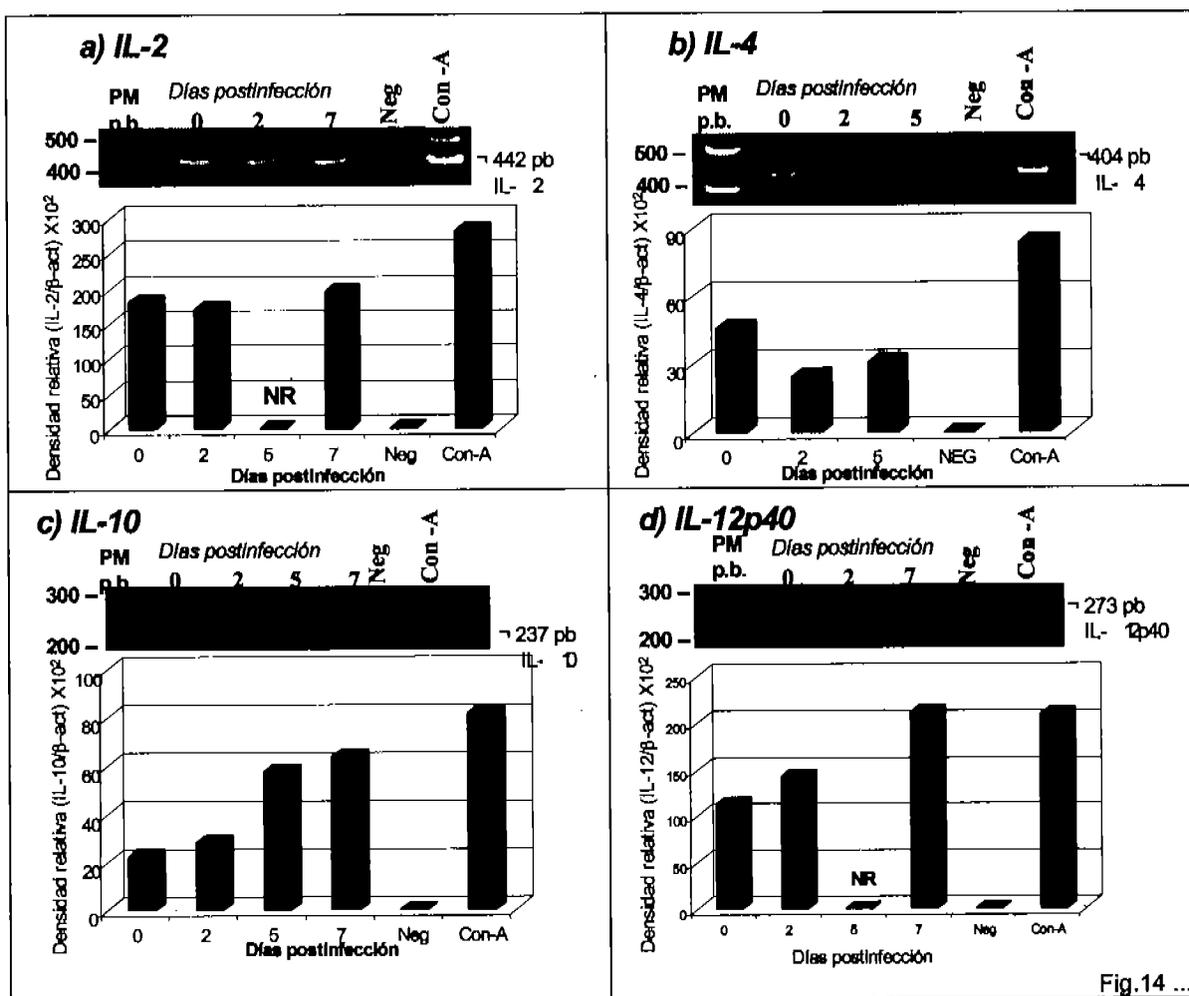
La Fig. 14 muestra gráficamente resultados representativos de un mínimo de 2 experimentos de las tendencias de la amplificación del mensaje para dichas citocinas y la β -actina. De estos experimentos se pudo determinar que el mensaje para β -actina se incrementa en un 10% al día 2 postinfección y hasta un 20% a los días 5 y 7, como consecuencia a la activación celular debido a la infección. Este incremento fue tomado en cuenta para determinar los niveles de mensaje para citocinas, como se describió anteriormente.

Al igual que en PP totales y en células provenientes de PP, en las células provenientes de GLM se observó la expresión de niveles constitutivos de mensaje para las citocinas ensayadas, previo a la infección. Siendo los mensajes constitutivos para IL-2, IL-10, IL-12 y TGF- β los más altos (Fig. 14 a, c, d y f). Es importante señalar que la amplificación de mensaje para IL-10 se realizó a una dilución de 1/10 de cDNA, por lo que el mensaje constitutivo relativo en la gráfica es en realidad mucho más alto.

A diferencia de los experimentos con células de PP, en estos ensayos se incluyó la amplificación de IL-4. Como se puede observar en la Fig. 14 b, no se detectó aumento de mensaje para esta citocina a los días 2 ó 5 postinfección. Por el contrario se observó un decremento conforme al nivel constitutivo en ambos días. Esto nos podría indicar una regulación negativa del mensaje para IL-4 en la infección por rotavirus.

Los mensajes para IL-10 y la cadena p40 de IL-12 mostraron una cinética de inducción similar ya que en ambos casos hubo un incremento inicial al día 2 que aumentó paulatinamente hasta llegar a un máximo al día 7 postinfección (Fig. 14 c y d). El mensaje para IFN- γ tuvo un incremento desde el día 2 manteniéndose a niveles similares al día 5 y llegando a un máximo al día 7. En el caso de los mensajes para IL-2 y TGF- β , se observaron incrementos muy bajos entre los días 5 y 7 postinfección. (Fig. 14 a y f). Es importante señalar que en todos los experimentos, el control positivo de amplificación para todas las citocinas evaluadas (blastos de linfocitos) funcionó eficientemente, lo cual valida las reacciones de RT-PCR.

Al igual que en PP, podemos decir que aunque a diferentes niveles y con diferente cinética, la infección por rotavirus induce la síntesis de RNAm para citocinas tipo Th1 (IL-2, INF- γ e IL-12), Th2 o T_R(IL-10) y Th3 (TGF- β) en células provenientes de GLM. Sin embargo, no hay que perder de vista que los incrementos de los mensajes para IL-2 y TGF- β fueron muy bajos. Por otro lado, la infección por rotavirus pudiera estar regulando negativamente el mensaje para al menos una citocina, como es el caso de IL-4. Finalmente, a excepción de los mensajes para IL-12 y TGF- β , el resto de las citocinas evaluadas en PP y GLM mostraron cinéticas diferentes, ya que en PP se observó un incremento del RNAm entre los días 2 y 5 para regresar al nivel basal al día 7, sin embargo, en GLM se observó un mínimo al día 2 llegando a un máximo al día 7.



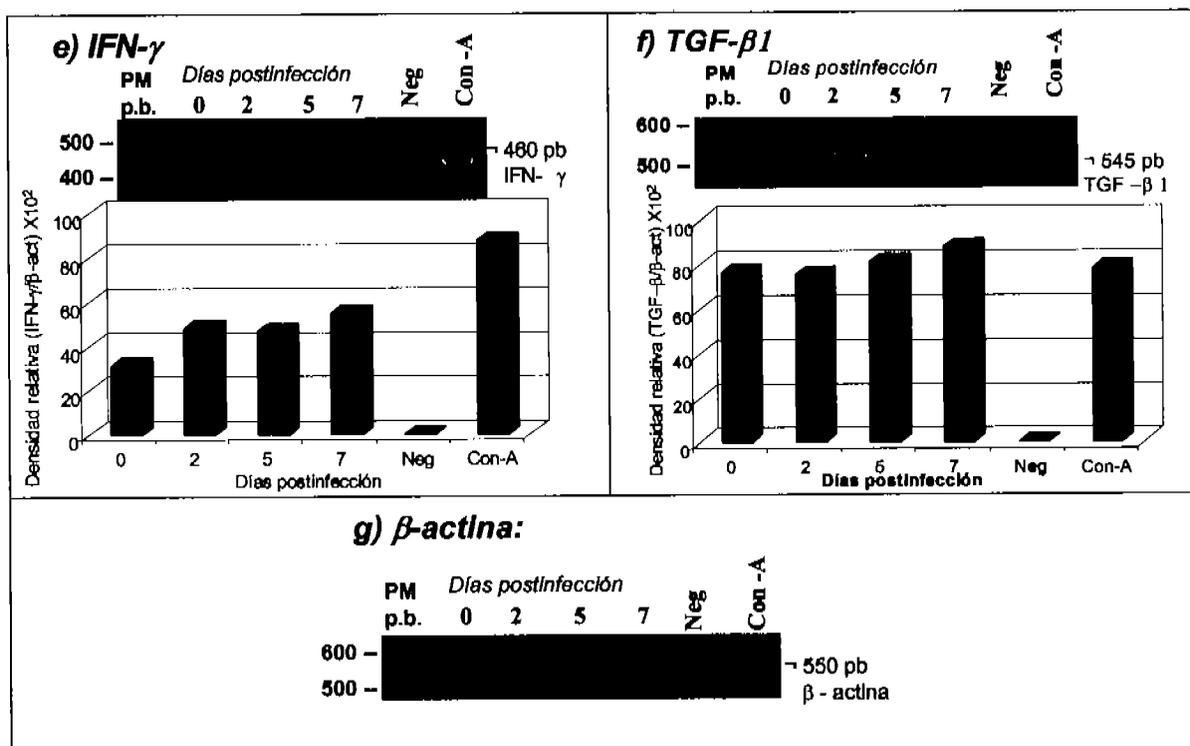
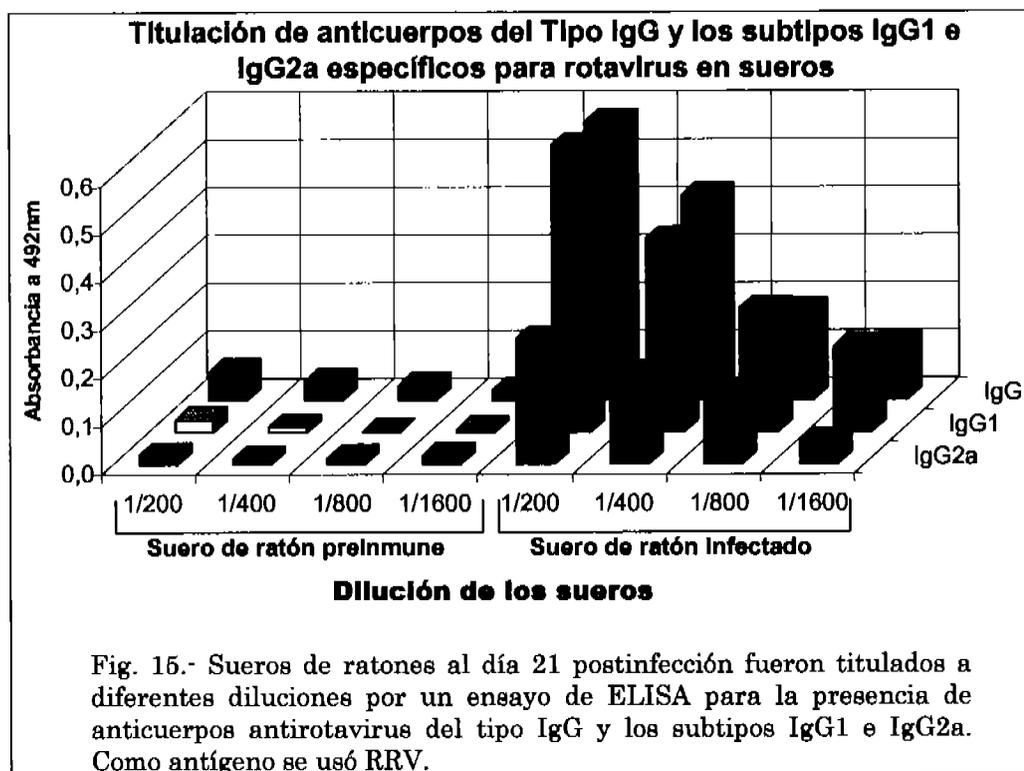


Fig. 14.- El RNA extraído de las células de los ganglios linfáticos mesentéricos de ratones infectados con rotavirus EDIM, fue sometido a reacciones de RT-PCR para amplificar los mensajes para: a) IL-2, b) IL-4, c) IL-10 (dil. 1/10 cDNA), d) IL-12, e) IFN- γ y f) TGF- β 1 (dil. 1/5 cDNA). Las densidades de banda para las citocinas fueron comparadas y graficadas con respecto a las bandas obtenidas de la amplificación de la g) β -actina. (NR= No realizado)

6.6. Perfil de anticuerpos IgG1 e IgG2a antirotavirus en Suero:

Con el fin de integrar la respuesta inmune humoral sistémica a nuestros resultados obtenidos en el análisis del mensaje para citocinas, se analizó la presencia de anticuerpos sericos antirotavirus de los subtipos IgG2a e IgG1 asociados a la respuesta tipo Th1 y Th2 respectivamente, ya descrito por Fromanti, C; y col. (1998) y por VanCott, y col. (2000) [56-57]. Se titularon los anticuerpos rotavirus específicos del tipo IgG y los subtipos IgG1 e IgG2a en sueros de 2 ratones de manera individual obtenidos al día 21 postinfección por ensayos de ELISA. Se encontró que el título de anticuerpos IgG e IgG2a fue de 1:1600, mientras que para IgG1 fue de 1:800. Este resultado sugiere que la inducción de la respuesta tipo Th1(IgG2a):Th2 (IgG1) por la infección por rotavirus a nivel sérico se da en una proporción 1:2 respectivamente (Fig. 15), lo cual corrobora el balance observado a nivel de mensaje para las diferentes citocinas en las PP y GLM.



6.7. Producción *in vitro* de anticuerpos específicos a rotavirus del tipo IgA, IgG e IgM de células de órganos de ratones infectados por EDIM.

Como se vio anteriormente a través de la proporción de anticuerpos IgG1/IgG2a a nivel sistémico, rotavirus induce un balance de citocinas del tipo Th1/Th2. Por esta razón se decidió evaluar *in vitro* la producción de anticuerpos específicos a rotavirus de las células aisladas de placas de Peyer, GLM y bazo de los ratones infectados por EDIM, con el fin de correlacionar la respuesta de anticuerpos en los diferentes órganos con los resultados obtenidos en la inducción del mensaje para las citocinas en respuesta a la infección.

Las células aisladas a diferentes tiempos de la infección fueron cultivadas durante 48 horas (1×10^6 cel/ml) con y sin Con-A. Los sobrenadantes celulares fueron colectados y ensayados mediante un sistema de ELISA de captura para determinar la secreción de anticuerpos específicos a rotavirus de los tipos IgA, IgG e IgM, con y sin estímulo de las células T para producir citocinas (Con-A) y determinar así la capacidad que tienen estas células de proliferación, activación e inducción de las células B al cambio de isotipo en los diferentes sitios en los que se lleva a cabo la respuesta inmune al virus.

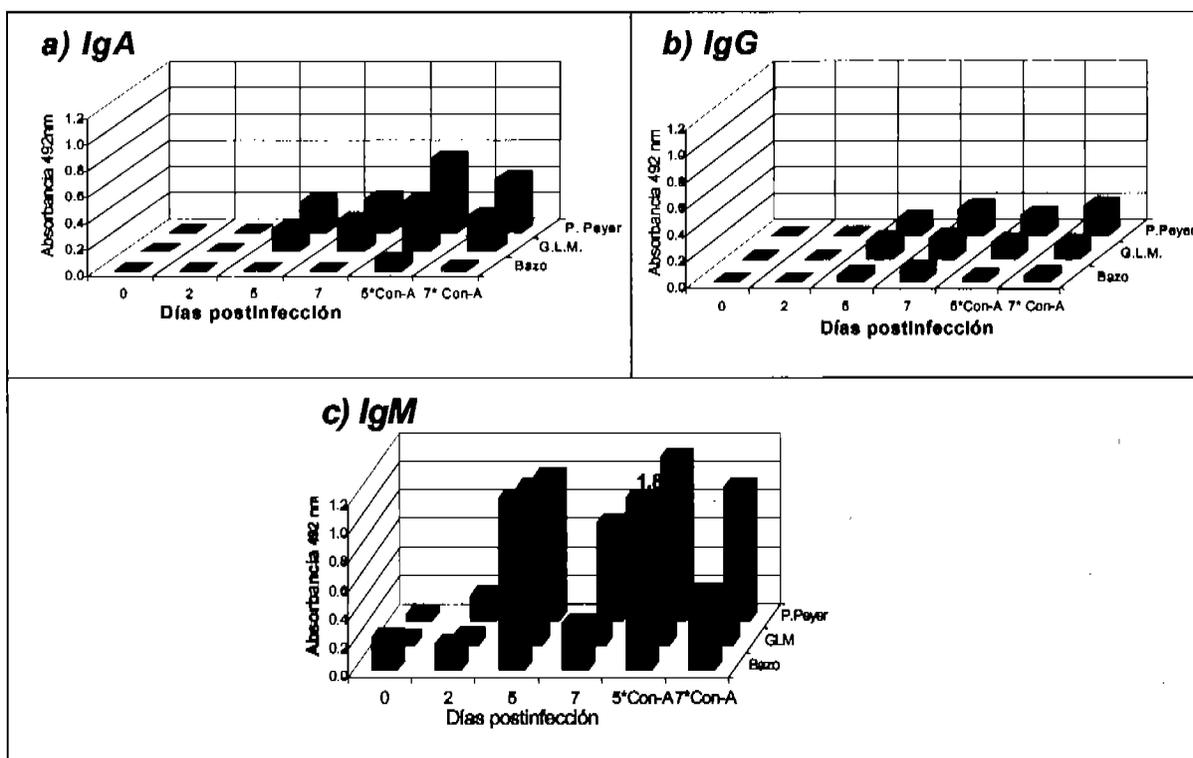


Fig. 16.- Las células obtenidas de PP, GLM y bazo a lo largo de la infección por EDIM, fueron cultivadas durante 48 horas. Los sobrenadantes celulares fueron colectados y ensayados por un sistema de ELISA de captura para determinar anticuerpos rotavirus específicos secretados por las células de los tipos a) IgA, b) IgG, y c) IgM, con y sin estímulo con Con-A. Como antígeno se usó RRV. c) IgM- para esta gráfica, 1.8 corresponde a la absorbancia obtenida en las células de bazo al día 5 estimuladas con Con-A.

La Fig. 16 muestra gráficamente los resultados obtenidos de un experimento. Se detectó que las células de placas de Peyer del día 2 postinfección son capaces de secretar anticuerpos solo del tipo IgM, detectando un aumento en la secreción de los mismos por las células del día 5 y una disminución de estos anticuerpos para las células del día 7. Así mismo, se detectó que las células del día 5 ya han iniciado el cambio de isotipo hacia IgA e IgG, pero la secreción de estos anticuerpos no es tan intensa como lo es para los anticuerpos del tipo IgM. Para los anticuerpos IgA, los niveles de secreción por las células al día 7 son similares a las del día 5, mientras que para los anticuerpos IgG aumentan al doble.

En el caso de los ganglios linfáticos mesentéricos, se detectó una muy baja secreción de anticuerpos del tipo IgM por las células del día 2 postinfección, mientras que aquellas aisladas al día 5 los secretan en grandes cantidades, con una clara disminución de estos por las células del día 7. Así mismo, detectamos que las células del día 2 de estos órganos no son capaces de secretar anticuerpos del tipo IgA e IgG. El cambio de isotipo se da entre los días 3 y 5 postinfección,

ya que en este último día detectamos una ligera producción de los mismos, manteniéndose en estos niveles la secreción de anticuerpos del tipo IgG y aumentando en un 40% para los anticuerpos del tipo IgA en las células del día 7 con respecto a las del día 5.

Para las células aisladas de bazo, se detectaron niveles significativos de anticuerpos naturales del tipo IgM previo a la infección (día 0), manteniéndose esta producción durante el día 2 y con un aumento significativo de secreción por las células del día 5, y una clara disminución en la secreción de estos anticuerpos por las células del día 7. Es importante destacar que estas células sin estímulo de citocinas, no fueron capaces de secretar anticuerpos del tipo IgA a lo largo de la infección. Sin embargo, anticuerpos del tipo IgG fueron detectados a niveles muy bajos en los sobrenadantes de las células del día 5 y con un ligero incremento en la secreción de estos anticuerpos por las células del día 7 postinfección.

En todos los casos, excepto para IgG (día 5) e IgA (día 7) de células de bazo, al estimular las células de los diferentes órganos con Con-A, se detectó un incremento en la secreción de los anticuerpos analizados, especialmente en las células provenientes de placas de Peyer. Este resultado nos indica por un lado, que de manera general, las células B activadas en presencia de citocinas provenientes principalmente de células T inducen el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas. Estos resultados sugieren además, que las células provenientes de placas de Peyer -como hemos mencionado con anterioridad- se encuentran en un microambiente supresor de la respuesta a citocinas de tipo inflamatorio, debido a que cuando las células totales son aisladas y estimuladas con Con-A, estas son capaces de inducir una mayor producción de anticuerpos que aquellas aisladas de GLM y/o bazo.

Este experimento sugiere que la distribución celular al sitio efector de la respuesta inmune y a nivel sistémico se da directamente de los ganglios linfáticos mesentéricos, ya que las células productoras de anticuerpos de los tipos IgA e IgG se encontraron únicamente en PP y GLM.

6.8. Análisis del mensaje para citocinas de células mononucleadas aisladas de bazo de ratones infectados con vaccinia.

Dado que en los experimentos anteriores con células de PP y GLM de ratones infectados con rotavirus no se tenía un parámetro comparativo *in vivo* para indicar si los niveles de los mensajes para las citocinas eran altos o bajos, se decidió analizar la inducción de mensaje para algunas citocinas en un modelo de infección por virus vaccinia.

Vaccinia es un virus de la familia Poxviridae, su genoma que consiste de una simple molécula de DNA de doble cadena, es el más grande de todos los viriones. Su estructura es la de un ladrillo con un diámetro aproximado de 200nm. A diferencia de la mayoría de los virus de DNA, éste se multiplica en el citoplasma y no en el núcleo de las células susceptibles [72, 74].

El virus vaccinia fue elegido para el estudio de la inducción del mensaje para las citocinas, debido a que es un virus altamente citopático e inmunogénico y en donde se ha visto que en ratones transgénicos, las citocinas tienen un papel inmunomodulador importante para la limpieza y protección contra el virus [73].

Ratones hembras fueron infectados intraperitonealmente con el virus vaccinia (2×10^7 ufp). A diferentes tiempos se aislaron las células de bazo, de donde se extrajo el RNA total, que fue analizado por electroforesis para determinar su estado. Una vez que se verificó la calidad del RNA, se sometió a ensayos de RT-PCR para determinar los niveles de mensaje para IL-10, IL-12 e IFN- γ y las densidades de banda fueron comparadas con respecto a la expresión del gen constitutivo para β -actina.

En la Fig. 17, se muestran gráficamente la inducción del mensaje para estas citocinas. Encontrando niveles bajos de expresión constitutiva para las citocinas analizadas y detectando que al día 1 postinfección hay un aumento considerable de los niveles de mensaje para IFN- γ , IL-10 e IL-12, en comparación con los niveles constitutivos.

Para todas las citocinas, los niveles de expresión inducidos comienzan a decrecer al día 2 hasta alcanzar nuevamente los niveles basales al día 3 postinfección.

Así en la infección por vaccinia, y en la respuesta a la infección en el ratón por un virus altamente citopático e inmunogénico, hay una fuerte la inducción de los mensajes para IL-12p40 e IL10, y una ligera inducción del mensaje para IFN- γ .

Con respecto a la infección por rotavirus, observamos que los niveles de inducción del mensaje para citocinas son más bajos que los observados en la infección por vaccinia.

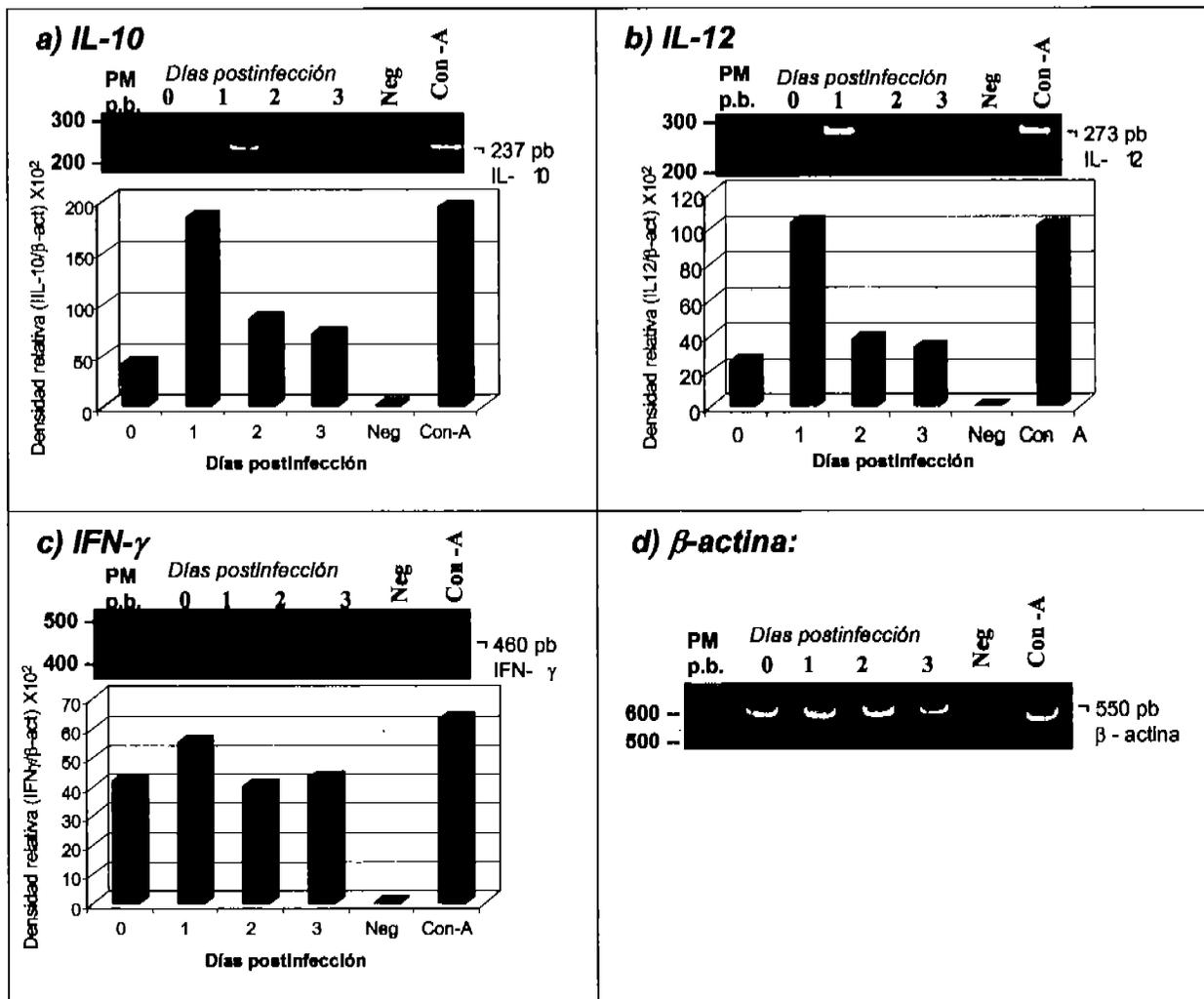


Fig. 17.- El RNA total extraído de Bazo de ratones infectados con el virus vaccinia, fué sometido a reacciones de RT-PCR para amplificar el mensaje para β -actina, IL-10 (dil. 1/10), IL-12 e IFN- γ y las densidades de banda para las citocinas fueron comparadas y graficadas con respecto a las bandas obtenidas de la amplificación de la β -actina.

7. DISCUSIÓN

Para la realización de este trabajo, se montó el modelo de infección por rotavirus en ratón adulto, con el fin de evaluar mediante la expresión del RNA mensajero para diferentes citocinas, el ambiente en que se desarrolla la respuesta inmune en PP y GLM durante la infección primaria.

En el modelo de ratón los rotavirus murinos silvestres muestran una cinética de replicación en forma de campana que inicia entre las 24 y 48 horas, y termina a los 7 u 8 días de infección. Mis resultados usando rotavirus EDIM silvestre corroboran estas observaciones, donde se tuvo detección del virus a las 48 hrs. de infección y una completa resolución de la misma al día 8. La respuesta inmune de anticuerpos obtenida en este estudio, confirma los trabajos antes descritos, en donde hay inducción de IgM, IgA e IgG en suero con una cinética clásica, siendo IgM el primer anticuerpo en aparecer, seguido por IgG e IgA. Así mismo, la respuesta inmune humoral en mucosas se ve reflejada con la producción de anticuerpos del tipo IgA intestinal, que correlaciona con la limpieza de la infección por rotavirus [19,22,28,62,67,76]. Por lo anterior, es claro que nuestro modelo de infección por rotavirus en ratones adultos BALB/c reproduce lo reportado tanto a nivel de replicación viral, así como de la respuesta inmune de anticuerpos, que valida los resultados subsecuentes obtenidos.

Como respuesta a la infección primaria inducida por rotavirus, se propuso evaluar el ambiente de citocinas producidas a nivel del RNA mensajero, directamente de los órganos completos (PP y GLM) de los ratones. La metodología utilizada durante este trabajo incluyó la extracción del RNA total, obtención del cDNA mediante reacciones de RT y la amplificación oligo selectiva de las secuencias para las citocinas por PCR. La calidad del RNA extraído de los órganos, se determinó por amplificación del mensaje para β -actina, que es frecuentemente utilizada como un control estándar en estudios de este tipo, pues se expresa constitutivamente en todas las células [61, 82-83].

Se realizaron las amplificaciones de los mensajes para algunas citocinas de las PP y se encontró una gran variabilidad en los niveles de expresión, a pesar de existir homogeneidad en las bandas correspondientes a los productos de la amplificación del mensaje para la β -actina. Se encontró mediante la electroforesis del RNA extraído, que las variaciones podrían haberse debido a la degradación del RNA total obtenido directamente de los órganos, y que su congelación no es suficiente para la preservación del RNA, ni para los objetivos que deseábamos alcanzar. Así mismo, se encontró que el RNA obtenido de células aisladas de órganos (PP y GLM) y estimuladas con Con-A y aparentemente no estaba degradado. Por lo que se pensó que el problema de degradación del RNA total podría resolverse al extraerlo directamente de

células aisladas de los órganos, disminuyendo la posibilidad de contaminación con ribonucleasas.

Además, se demostró que el RNA utilizado en las reacciones de RT-PCR estaba en exceso por lo que se establecieron nuevamente las condiciones para la amplificación de los mensajes para las citocinas, determinando así que la cantidad idónea de RNA para llevar a cabo las reacciones de RT era de 0.1µg de RNA por cada µl total de la reacción de RT.

Una vez establecidas las condiciones de amplificación, decidimos ensayarlas para determinar la cinética de inducción del mensaje para las diferentes citocinas en respuesta a la infección por rotavirus en las células aisladas de PP y GLM de los ratones infectados.

Un evento particular encontrado en nuestro sistema de amplificación en los controles con Con-A, así como en nuestro modelo de infección por rotavirus, es que la expresión del mensaje para la β -actina no es constante en todas las células. Este fenómeno había sido descrito por T. Mosmann [75], en donde explica que al activar las células T con Con-A, la expresión del mensaje para β -actina se incrementa. En este trabajo se encontró que tanto en PP, como GLM hay un ligero incremento del mensaje para la β -actina, como consecuencia posiblemente de la activación celular en respuesta a la infección, pero que no es tan fuerte comparado con las células que se cultivan con mitógenos como Con-A. Esto fue tomado en cuenta para determinar los niveles de expresión de los mensajes para las citocinas a analizar.

De acuerdo a lo encontrado en la amplificación de los mensajes para citocinas en órganos completos y en las células aisladas de los ratones infectados, se determinó que tanto en PP como en GLM de ratones BALB/c, se expresan constitutivamente los mensajes para IL-2, IL-4, IL-5 (no mostrado en GLM), IL-10, IL-12p40, IFN- γ y TGF- β . De los cuales IL-10, IL-12p40 y TGF- β tienen los niveles expresión más altos en PP, e IL-2, IL12p40, IL-10 y TGF- β en GLM. Este hecho correlaciona con lo reportado para estudios de PP de algunas cepas de ratones, en que se ha observado expresión constitutiva de los genes para IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p40, e IFN- γ . La expresión constitutiva de los mensajes para estas citocinas aparentemente se debe a que éstas participan en la homeostasis del órgano, particularmente en el intestino, donde los niveles son más altos que en GLM y en bazo [66, 71, 78].

En respuesta a la infección por rotavirus, en células de PP se encontró que al día 2 postinfección se induce la expresión de los mensajes para IL-2 e IFN- γ , siendo este último el que se expresa con mayor intensidad. Al día 5, se encontró un considerable aumento del mensaje para IL-10. Y por último, al día 7, un ligero incremento del mensaje para IL-12p40 y TGF- β . A este tiempo, se pudo

detectar que los mensajes tanto para IL-2, como para IFN- γ regresan a los niveles basales de expresión.

Es importante destacar que el incremento del mensaje para IL-10 al día 5 de la infección correlaciona con el inicio de la disminución del mensaje para IFN- γ . Se ha descrito en estudios *in vivo*, que IL-10 es un potente inhibidor de citocinas proinflamatorias, así como de la producción de IL-12 por M Φ s y CD8 [73].

En estudios similares de infección por reovirus se ha descrito que en las PP hay un aumento en la expresión del mensaje para IFN- γ , mientras que el nivel de expresión de los mensajes para IL-4 e IL-5 no se altera por la infección; estos resultados son muy afines a lo observado en nuestro sistema (datos no mostrados para IL-4 e IL5) [71]. Los reovirus, al igual que rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*, infectan en un inicio a los enterocitos intestinales, se adhieren a las células M y se replican en PP para generar posteriormente una infección sistémica.

Al analizar los mensajes para citocinas en células de GLM como respuesta a la infección por rotavirus, encontramos inducción para IL-10, IL-12p40 e IFN- γ al día 2 postinfección, siendo IL-10 el que alcanza los valores máximos al día 7. Mientras que entre los días 5 y 7 el mensaje para TGF- β se incrementa ligeramente, el mismo efecto fue observado al día 7 para IL-2.

En nuestro laboratorio se ha intentado determinar si la inducción de los mensajes para la citocinas en la infección por rotavirus en el ratón correlaciona con la producción de las mismas a nivel proteico. (Tesis de licenciatura, Mayté Cervantes) Estudios preliminares por análisis de las citocinas intracelulares por citometría de flujo, indican que el incremento de la producción de IFN- γ e IL-12 en PP así como IL-10 e IL-12 en GLM, corresponden a lo hallado en este estudio a nivel de mensajero [70].

Contrario a lo esperado, los niveles de inducción de mensaje para citocinas en PP como respuesta a la infección por rotavirus son muy bajos en comparación a los niveles en bazo en la infección por vaccinia. Esto correlaciona con el bajo incremento de la población celular en PP, en donde como respuesta a la infección, se encontró un incremento poblacional del 40%. Mientras que en GLM, el incremento en la población celular alcanza niveles de hasta 170%. Posiblemente al ambiente regulatorio y supresor de la respuesta inflamatoria que se da en la mucosa intestinal disminuya por un lado la expresión de citocinas proinflamatorias, así como la proliferación de algunas poblaciones celulares en las PP.

En la cinética realizada para determinar la producción de anticuerpos IgM, IgG e IgA específicos para rotavirus por células de PP y GLM en cultivo. Los anticuerpos IgM se detectaron a partir del día 5 en las células de todos los órganos y disminuyen drásticamente al día 7. Posiblemente las células B estimuladas en PP viajan a GLM y bazo dentro de un periodo de 5 días, sin embargo, las células productoras de anticuerpos IgA e IgG se encuentran hasta el día 7 exclusivamente en PP y GLM. Probablemente estas células tardan más en llegar a bazo, aunque es sabido que después de una respuesta en mucosas muy pocas células B productoras de IgA se alojan a nivel sistémico [49]. La secreción de anticuerpos IgM observada en las células de todos los órganos, quizá es un mecanismo que impide la diseminación de rotavirus a nivel sistémico [68].

En las infecciones a nivel sistémico la respuesta inmune de citocinas es más rápida que la desarrollada a nivel de mucosa intestinal, lo que se pudo apreciar en las infecciones por vaccinia y rotavirus. La expresión constitutiva de los mensajes para citocinas es más baja en el bazo que en intestino, y la inducción es más lenta y con menor intensidad en la infección por rotavirus. Esto puede ser debido a los altos niveles constitutivos de mensaje encontrados en PP, y al ambiente regulatorio intestinal influenciado por TGF- β , donde los altos niveles de mensaje para esta citocina podrían estar relacionados con la regulación de IFN- γ y del daño tisular que se produce durante la respuesta inmune tipo Th1 [69]. Así mismo, TGF- β inhibe potencialmente la proliferación de las células T y B y las funciones efectoras de las células T, regulando principalmente a las células Th [15,16]. Esta citocina está relacionada a la tolerancia a alimentos, y actualmente está siendo ampliamente estudiada en modelos de colitis ulcerativa, inflamación intestinal y tolerancia oral [61,69]. En estudios con ratones KO para algunas citocinas, como IL-2, IL-10 y TGF- β , se ha observado que estos desarrollan inflamación en intestino delgado y en colon, ya que hay una desregulación de algunas citocinas involucradas en la homeostasis intestinal. En el caso de los KO para IL-2, la producción del mensaje de TGF- β en el intestino del ratón es nula, y correlaciona con la manifestación de colitis severa, provocando además una alta inducción del mensaje para IFN- γ [61].

En este trabajo no fue posible determinar las poblaciones celulares que se activan y secretan citocinas como respuesta a la infección por rotavirus. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en estudios preliminares realizados en el laboratorio (Mayté Cervantes, 2003) [70], se ha observado que en PP y GLM las principales fuentes de IFN- γ , IL-12 e IL-10 son las células B, seguidas por las células T y las CDs. Nuevamente estos resultados demuestran que el ambiente de GLM es más permisivo, pues en PP la principal población celular productora de citocinas son las células B, mientras que en GLM la producción está distribuida en varias poblaciones celulares. Esto correlaciona con el bajo incremento celular en PP y alta en GLM observada durante el desarrollo de

este trabajo, así como con capacidad proliferativa de las células B en respuesta a la infección por rotavirus, en PP y GLM [20]. Por lo anteriormente descrito, posiblemente TGF- β regule el proceso inflamatorio en respuesta a la infección y no permita la proliferación de las células T y obstaculice sus funciones efectoras. Esto como un mecanismo de control de la respuesta inmune en intestino, mediante la regulación transcripcional de las diferentes citocinas, que permite una respuesta inmune eficiente pero al mismo tiempo mantenga la integridad del tejido intestinal.

Las células dendríticas mieloides en las PP expresan constitutivamente mensaje para TGF- β ; esta población podría ser la responsable de los altos niveles de mensaje para esta citocina encontrados en este sitio y que a su vez inducen la generación de células T regulatorias secretoras de IL-10 (T_R1) o de TGF- β (Th3).

Finalmente, en este trabajo se encontró que la inducción de la respuesta inmune a rotavirus en el ratón, en relación al ambiente de citocinas a nivel de mensajero encontrado tanto en placas de Peyer, como en GLM presenta un patrón mixto y no prolongado de los tipos Th1 (IL-12, IFN- γ , IL-2), Th2 o T_R1(IL-10) y Th3 (TGF- β). Encontrándose que en PP la respuesta es más temprana que en GLM, debido a que estos son los sitios de inducción de la respuesta inmune de donde los linfocitos activados viajan a GLM, o bien, este viaje es realizado por las CPAs cargadas de antígeno y en este sitio activan algunas poblaciones celulares responsables de la secreción de citocinas. La presencia de un ambiente mixto de la respuesta inmune de citocinas durante la infección, correlaciona con la inducción de anticuerpos séricos antirotavirus característicos de la respuesta inmune tipo Th1 y Th2, como son IgG2a e IgG1 respectivamente, en donde en relación al título de anticuerpos la inducción de la respuesta de los tipos Th1:Th2 es 1:2. Así mismo, la respuesta de citocinas correlaciona con la generación de células plasmáticas en PP y GLM que tienen la capacidad de producir anticuerpos de los tipos IgA, IgM e IgG. Mientras que la inducción de los mensajes para TGF- β e IL-10 correlaciona con la producción de anticuerpos del tipo IgA intestinales específicos para rotavirus, ambas citocinas han sido descritas como inductoras del cambio de isotipo de IgM hacia IgA [8,9,15,16,33]. Los balances de las respuestas Th1/Th2 en el ratón han sido observados en infecciones de mucosa vaginal por el virus herpes simples (HSV) y en la infección por reovirus, mientras que una respuesta polarizada a una de las repuestas de citocinas ha sido observada en infecciones crónicas persistentes [15].

Se han utilizado virus atenuados heterólogos como vacunas en humanos, como por ejemplo rotavirus de simio RRV y de humano WA; sin embargo, en el caso de RRV (vacuna tetravalente) se han encontrado efectos colaterales de invaginación intestinal, además de necesitar de al menos 3 dosis para generar una protección contra la patología, más no contra la infección [60]. Conocer el patrón de citocinas en la infección primaria por rotavirus en el ratón es de especial interés debido a que éste podría aportar datos importantes para la inducción de una respuesta inmune adecuada en desarrollo de vacunas para rotavirus.

8. Conclusiones

1. Se montó el modelo de infección por rotavirus en el ratón adulto, para evaluar los diferentes mecanismos involucrados en la respuesta inmune intestinal. Las cinéticas de replicación viral, así como de producción de anticuerpos séricos (IgM, IgA e IgG) e intestinales (IgA) específicos para rotavirus, son consistentes con los datos reportados previamente.
2. Se montó el sistema de detección de RNA mensajero por RT-PCR para IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p40, IFN- γ , TGF- β y β -actina como control constitutivo, de ratón.
3. Tanto en PP como en GLM, existe un patrón mixto y no prolongado del perfil de citocinas de los tipos tanto Th1 (IL-12p40, IL-2 e IFN- γ), Th2 o T_R1 (IL-10) y Th3 (TGF- β), que correlaciona con la producción de anticuerpos a nivel sistémico.
4. La activación de las células en PP se inicia en la etapa temprana de la infección por rotavirus, mientras que en GLM la activación es posterior, demostrando así los diferentes estadios de la respuesta inmune intestinal.
5. Este perfil es parte de una respuesta inmunoprotectora, que al mismo tiempo garantiza la integridad del órgano, evitando una respuesta inflamatoria exagerada.

9. Perspectivas

1. Por citometría de flujo determinar la producción de las citocinas en PP y GLM a lo largo de toda la infección por rotavirus y correlacionarla con la inducción del mensaje encontrado en este trabajo. Para de esta manera, verificar las observaciones preliminares del laboratorio.
2. Analizar a nivel de mensajero y proteína la inducción de citocinas en lámina propia, que es el sitio efector de la respuesta inmune intestinal.
3. Determinar por citometría de flujo, las poblaciones responsables de la secreción de las citocinas en PP, GLM y LP intestinal.
4. Analizar la respuesta inmune de citocinas y las poblaciones involucradas en la infección por virus heterologos comúnmente usados como vacunas, como RRV y Wa, los cuales inducen protección solo después de 2 o 3 inmunizaciones.
5. Utilizar vectores virales, proteínas o partículas virales, así como plásmidos que mediante el uso de adyuvantes, induzcan una respuesta inmune de citocinas similar a la infección primaria y que confieran protección a rotavirus, para ser usadas como posibles vacunas.

10. Bibliografía.

1. Gray, J; Desselberg, U.; Rotavirus. Methodos and Protocols; Humana Press; 2000.
2. Shaw, RD, Greenberg, HB, Estes, MK; Rotaviruses (Reoviridae); 1999 Acad. Press.
3. Clark Fred, Glass, R.I., Offit, P.A.; Rotavirus Vaccines. Selected vaccines of the future. 987-1005.
4. Mota, H.F.; Gutierrez, C.C.; Villa, C.S.; Calva, M.J.; Arias, C.; Padilla, N.L.; Guiscafre, G.H.; Diarrea por Rotavirus; Salud Publica de México; 2001; 43:524-528.
5. Larrosa, H.A., Ruiz, P.M., Aguilar, B.S.; Utilidad del estudio de las heces para el diagnostico y manejo de lactantes y preescolares con diarrea aguda. Salud Publica de México; 2002; 44:328-334.
6. Estes, M.K.; Rotaviruses and their replication. Fields Virology; 1996,1625-1655.
7. Osborne, M.P., Haddon, S.J., Collins, J., Starkey, W.G., Wallis, T.S., Clarke, G.J., Worton, K.J., Candy, D.C.A., Stephen, J.; An Electron Microscopic Investigation of Time-related changes in the intestine of neonatal mice infected with Murine Rotavirus; Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition; 1998, 7: 236-248.
8. McGhee, J.R., Kiyono, H.; The mucosal immune system; Fundamental Immunology, 1999: 909-944
9. Nagler-Anderson, Cathryn; Man the barrier! Strategic defenses in the intestinal mucosa. 2001; 1: 59-67.
10. Jepson, M.A., Clark, M.A.; Studying M cells and their role in infection. Trens in Microbiology; 1998:6:359-365.
11. Rescigno, M, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nature Immunology; 2001, 2:361,367.
12. Nigel Williams. T cells on the Mucosal Frontline. Science 1998; 280:198-200.
13. Rollo, E.E., Kumar, K.P., Reich, N.C., Cohen, J., Angel, J., Greenberg, H.B., Sheth, R., Anderson, J., Oh, B., Hempson, S.J., Mackow, E.R., Shaw, R.D.; The epithelial cell response to rotavirus infection. Journal of Immunology, 1999; 163:4442-4452.
14. Burns, JW, Krishnaney, AA, Vo, PT, Rouse, RV, Anderson, LJ, Greenberg, H; Analyses of Homologous Rotavirus infection in the mouse model. Virology; 1995, 207:143-153.
15. Goldsby R. A., Kindt, T.J., Osborne, B.A.; W. H Immunology (Kuby);. Freeman and Company. 4° edición; 11-20.
16. Hamblin, AS; Cytokines and cytokine receptors; IRL. 1993. Oxford Univ. Press
17. Staats, H.F., Jackson, R.J., Marinaro, M., Takahashi, I., Kiyono, H., McGhee, J.R.; Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development; Current Opinion in Immunology; 1994, 6: 572-583.
18. Gewirtz, A.T., Madara, J.L; Periscope, Up! Monitoring microbes in the intestine; Nature Immunology; 2001, 2:288-290.
19. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. Emerg Infect Dis. 2003. 9(5):565-72.
20. Blutt, SE, Warfield, KL, Lewis, DE, Conner, ME; Early response to rotavirus infection involves massive B cell activation. J. of Immunology 2002, 168:5716-5721.
21. Riepenhoff-T, M., Dharakul, T., Kowalski, E., Michalak, S., Ogra, P.L.; Persistent rotavirus infection in Mice with Severe Combined Immunodeficiency. Journal of Virology, 1987, 61: 3345-3348.
22. Franco, M.A., Greenberg, H.B; Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. Virology, 1997, 238:169-179.

23. Franco, MA., Greenberg, HB; Role of B cells and Cytotoxic T Lymphocytes in clearance of immunity to rotavirus infection in mice. *J.Virology* 1995 69:7800-7806.
24. Moser, C.A., Cookinham, S., Coffin, S.E., Clark, H.F., Offit, P.A.; Relative importance of Rotavirus-specific effector and memory B cells in protection against challenge; *Journal of Virology*; 1998, 72:1108-1114.
25. Williams M.B., Rosé, J.R., Rott, L.S., Franco, M.A., Greenberg, H.B., Butcher, E.C.; The memory B cell subset responsible for secretory IgA response and protective Humoral Immunity to rotavirus expresses the intestinal Homing Receptor, $\alpha 4\beta 7$. *Journal of Immunology*, 1998; 161:4227-4235.
26. McNeal, M.M., Ward, R.L.; Long Term production of rotavirus antibody and protection against reinfection following a single infection of neonatal mice with murine rotavirus. *Virology*; 1995;211:474-480.
27. Kushnir N, Bos NA, Zuercher AW, Coffin SE, Moser CA, Offit PA, Cebra JJ; B2 but not B1 Cells can contribute to CD4+ T-cell-mediated clearance of rotavirus in SCID mice. *Journal of Virology*, 2001;75:5482-90.
28. Franco, M.A., Greenberg, H.B. Immunity to rotavirus infection in mice.: *The Journal of Infectious Diseases*; 1999, 197(S3):S466-S469.
29. Lopez S, Arias CF. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 2004 Jun;12:271-8.
30. O'Neal, C.M., Harriman, G.R., Conner, M.E.; Protection of the villus Epithelial cells of the small intestine from rotavirus infection does not require immunoglobulin A. *Journal of Virology*, 2000, 74: 4102-4109.
31. Janeway, CA, Travers, P, Walport, M, Shlomchik, M. *The adaptative Immune Response*; Immunobiology; Garland Publishing; 5a. Ed. 2001.
32. Austin, J.M. *Antigen Presenting Cells*. Oxford University Press, 1989.
33. Sompayrac, L. *How the Immune System Works*; Blackwell Publ.; 2a. Ed. 2003.
34. Palmer, E.; Cresswell, P.; *Mechanisms of MHC Class I-Restricted antigen Processing*; *Annu. Rev. Immunol.*; 1998; 16:328-358.
35. Raffi Ahmed, Biron C.A.; *Immunity to Viruses*; *Fundamental Immunology*; William Paul; 4a. ed. 1999; 39:1295-1333.
36. Dharakul, T; Root, L; Greenberg HB; Recovery from chronic rotavirus infection in mice with severe combined immunodeficiency: virus clearance mediated by adoptive transfer of immune CD8+ lymphocytes. *Journal of Virology*; 1990; 64:4375-4382.
37. Offit PA, Dudzik KI; Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes passively protect against gastroenteritis in suckling mice. *Journal of Virology*; 1990; 64:6325-6328.
38. McNeal, M.M., Barone, K.S., Rae, M.N., Ward, R.L.; Effector Functions of Antibody and CD8+ cells in Resolution of rotavirus infection and protection against reinfection in mice. *Virology*, 1995; 214:387-397.
39. McNeal, M.M., Rae, M.N., Ward, R.L.; Evidence that resolution of rotavirus infection in mice is due to both CD4 and CD8 cell dependent activities. *Journal of Virology*, 1997, 71: 8735-8742.
40. Franco, M.A., Tin, C., Rott, L.S., VanCott, J.L., McGhee, J.R., Greenberg, H.B.; Evidence for CD8+ T-cell immunity to murine rotavirus in the absence of Perforin, Fas, and Gamma Interferon. *Journal of Virology*, 1997, 71: 479-486.
41. Rosé, J.R., Williams, M.B., Rott, L.S., Butcher, E.C., Greenberg, H.B.; Expression of the mucosal homing receptor $\alpha 4\beta 7$ correlates with the ability of CD8+ memory T cells to clear rotavirus infection. *Journal of Virology*, 1998, 72:726-730.

42. Kuklin N.A.; Rott L.; Darling J.; Campbel J.J.; Franco, M.; Feng N.; Müller W.; Wagner N.; Altman J.; Butcher EC; Greenberg H; $\alpha 4\beta 7$ independent pathway for CD8+ T cell-mediated intestinal immunity to rotavirus. *Journal of Clinical Investigation*; 2000; 160:1541-1552.
43. Marks M.S.; Protein sorting within the MHC Class II. Antigen processing pathway; *Immunology Research*; 1998;17/1&2:141-154.
44. Cresswell P.; Assembly, transport, and function of MHC Class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.*; 1994; 12:259-293.
45. Villadangos, J.A.; Ploegh, H.L.; Proteolysis in MHC Class II Antigen Presentation: Who's in Charge? *Immunity*; 2000; 12:233-239.
46. Romagnani S.; Understanding the role of Th1/Th2 cells in infection. *Trends in Microbiology*; 1996; 4:470-473.
47. Murphy, K.M; Reiner, S.L.; The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews, Immunology*; 2002; 2:933-944.
48. Murphy, K.M.; T lymphocyte differentiation in the periphery; *Current Opinion in Immunology*; 1998, 10; 226-232.
49. Murphy, BR; Mucosal Immunity to Viruses; *Handbook of mucosal immunology*; 1994; 333-341.
50. Biron, C.A.; Cytokines in the generation if immune responses to, and resolution of virus infection; *Current Opinion in Immunology*; 1994, 6; 530-538.
51. Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D.; Cell Cooperation in the Antibody response; *Immunology*; 1998; 11:139-153.
52. Root, L.S, Rossé, J.R., Bass, D., Williams, M.B., Greenberg, H.B. Butcher, E.C.; Expression of mucosal homing receptor $\alpha 4\beta 7$ by circulating CD4+ cells with memory for intestinal rotavirus. *The Journal of Clinical Investigation*, 1997, 100:1204-1208.
53. Sheth, R., Anderson, J., Sato, T., Oh, B., Hempson, S.J., Rollo, E., Mackow, E.R., Shaw, R.D.; Rotavirus stimulates IL-8 secretion from cultured Epithelial cells; *Virology* 1996; 221:251-259.
54. Coligan, JE, Kruisbeek, AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober, W; *Current Protocols in Immunology*. 2003 2(S14):10.23.3.
55. Angel, J., Franco, M.A., Greenberg, H.B., Bass, D.; Lack of a Role for Type I and Type II Interferons in the resolution of rotavirus-induced diarrhea and infection in mice. *Journal of Interferon and cytokine Research*. 1999, 19:655-659.
56. VanCott, J.L., Franco, M.A., Greenberg, H.B.; Sabbaj, S, Tang, B., Murray, R., McGhee, J.R., Protective immunity to rotavirus shedding in the absence of Interleukine-6: Th1 Cells and Immunoglobulin A develop normally. *Journal of Virology*, 2000, 74: 5250-5256.
57. Fromantin, C., Piroth, L., Petitpas, I., Pothier, P., Kohli, E.; Oral delivery of Homologous and heterologous strains of rotavirus to BALB/c mice induces the same profile of cytokine production by spleen cells. *Virology*; 1998, 244:252-260.
58. Fearon, D.T., Locksley R.M. The instructive role of innate immunity inn the acquired immune response. *Science*; 1996, 272:50-53.
59. Abbas, AK., Lichtman, AH. *Inmunología Celular y molecular*. Ed. Elsevier. 2004.
60. Kombo, L.A., Gerber, M.A., Pickering L.K., Atreya, C.D., Breiman, R.F. Intrussupception, infection, and immunizations: Summary of a woorkshop on rotavirus. *Pediatrics*, 2001; 108: 1-7.

61. Autenrieth I.B.; Bucheler N, Bohn E, Heinze G, Horak I.; Cytokine mRNA expression in intestinal tissue of interleukin-2 deficient mice with bowel inflammation; *Gut*; 1997; 41: 793-800
62. Bouvet J-P, Dighiero, G., 1998. From natural polyreactive antibodies to À LA Carte Monoreactive antibodies to infectious agents: is it a small world after all? *Infection and Immunity*. 66:1-4.
63. Boes M, 2000. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol. Immunology*. 37:1141-1149.
64. Chomczynski, P, et al. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochemistry*. 1987;162: 156-159
65. Clark, S.M.; Trypsin enhancement infectivity: mechanism of enhancement; *Journal of Virology*; 39(3): 816-822 (1981)
66. Zhou, H-R., Yan, D., Pestka, J.J.; Differential cytokine mRNA expression in mice after oral exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol): dose response and time course. *Toxicology and applied pharmacology*; 1997, 144: 294-305.
67. Ward, R.L., McNeal, M.M., Sheridan, J.F. Development of an Adult Mouse model for studies on Protection against rotavirus. *Journal of Virology*; 1990, 64:5070-5075.
68. Mossel, EC, Ramig, RF A lymphatic mechanism of rotavirus extraintestinal spread in the neonatal mouse. 2003, 77:12352-12356.
69. Mac Donald, T.T., Monteleone, G. IL-12 and Th1 immune responses in human Peyer patches. *Trends in Immunology*. 2001; 22:244-247.
70. Cervantes B. Mayté G. Análisis del perfil de citocinas expresadas por diferentes poblaciones celulares en organos linfoides asociados a mucosa intestinal en ratones infectados con rotavirus. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 2003.
71. Fan, JY. Boyce, C.S., Cuff, C.F. T-Helper 1 and T-Helper 2 cytokine responses in gut associated Lymphoid Tissue following enteric reovirus infection. *Cellular Immunology*, 1998, 188:55-63.
72. Plotkin, SA; Orestein, WA; Vaccines; W.A. Saunders Company. 3a. Edición, 1999.
73. Van der Broek, M., Bachmann, M., Köhler G., Barner, M., Escher, R., Zinkernagel, R., Kopf, M. IL-4 and IL-10 antagonize IL-12 mediated protection against acute vaccinia virus infection with a limited role of IFN-g and Nitric Oxide Synthetase 2. *The Journal of Immunology*, 2000, 164:371-378.
74. Moos, B. Vaccinia virus: A tool for research and vaccine development. *Science*, 1991, 252: 1662-1667.
75. Mosmann, T. Letters. Replay to Cohen. *Immunology Today*. 2000, 21:199-200.
76. Offit, P.A. Immunologic determinants of protection against rotavirus disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology*; 1994, 185:230-254
77. Ward, R.L., Mc Neal M.M., Sheridan J.F. Evidence that active Protection following Oral Immunization of Mice with Live rotavirus is not dependent on neutralizing Antibody. *Journal of Virology*, 1992, 188:57-66.
78. Jiangchun X., Kijono, H., Jackson, R.J., Staats, H.F., Fujihashi, K., Burrows, P.D., Elson, C.O., Pillai, S., McGhee, J.R. Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: Oral immunization with Tetanus Toxoid and Cholera Toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in Mucosal Associated Tissues. *J. Exp. Med.*; 1993, 178:1309-1320.