

TESIS DE DOCTORADO

**INFECTÓMICA Y
VACUNÓMICA APLICADA AL
ESTUDIO DEL ROTAVIRUS**

José Gómez Rial

A large, light blue watermark of the USC logo is positioned diagonally across the center of the page. The logo consists of the letters 'USC' in a large, bold, sans-serif font, with the full name 'UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' written in a smaller font below it.

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL USC (EDIUS)
PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES E NOVAS ESTRATEXIAS EN CIENCIAS
FORENSES

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2020

DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Infeciómica y Vacunómica aplicada al estudio del Rotavirus

D. JOSE GOMEZ RIAL

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela 12 de Mayo de 2020

Fdo.....



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

**Infectómica y Vacunómica aplicada al estudio del
Rotavirus**

Prof. Dr. D. ANTONIO SALAS ELLACURIAGA
Prof. Dr. D. FEDERICO MARTINÓN TORRES

INFORMA/N:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. JOSE GÓMEZ RIAL, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela 12 de Mayo de 2020

Fdo.....

Prof. Dr. Antonio Salas

Fdo.....

Prof. Dr. Federico Martinón-Torres

A la memoria de mis padres
A mi mujer Carolina y mis hijos Manuel y Merce



Agradecimientos

Ha sido un largo camino hasta llegar a la consecución de este objetivo. Son muchas las personas a las que le debo mi más sincero agradecimiento y sin las cuales esta empresa no hubiese podido llegar a su fin.

En primer lugar, mi más profundo agradecimiento a mis directores de Tesis, los profesores Federico Martín Torres y Antonio Salas Ellacuriaga, Fede y Toño, mis maestros, mis amigos, mis mentores. Sin ellos habría dejado ya hace mucho tiempo este mundo de la investigación. Solo su constante motivación y entusiasmo diario me ha permitido llegar al final del camino. Nunca en la vida he conocido a personas tan brillantes y a la vez tan generosas. Grandes maestros en lo profesional y en la vida, a los que no me cansaré nunca de agradecer que me hayan incorporado a su mundo de este modo. Gracias por compartir tanto conmigo.

A todas las personas que forman y han formado el grupo de investigación en vacunas, infecciones y pediatría (GENVIP) Todos y cada uno de ellos han dejado una impronta en este trabajo de algún u otro modo. Una gran familia dispuesta a colaborar en cualquier trabajo que se le solicitase, sin pedir nada a cambio. Han sido y serán mis compañeros de viaje en este ingrato, pero a la vez fascinante mundo de la ciencia y la investigación. En especial debo agradecer a mi compañera María José Currás Tuala, toda su labor y apoyo prestado para la realización de gran parte del trabajo experimental de esta tesis.

A mis compañeros del Servicio de Inmunología del Hospital Clínico de Santiago, mi lugar de trabajo, por haberme aguantado todo este tiempo y haberme apoyado hasta el final en la consecución de este trabajo.

A mis padres, Pepe y Merche, donde quiera que estén, personas humildes y trabajadoras que renunciaron a tanto para que sus hijos pudiesen conseguir los éxitos personales y profesionales actuales. Llevaré siempre conmigo una losa al no poder haber conseguido este pequeño logro antes que el caprichoso destino me los arrebatase de forma tan prematura. Aquí la tienes papá, la tesis.

A mis hijos Manuel y Merce, el futuro es vuestro, aprovechad lo que os dejo y aprended de mis errores. Papá ha terminado la tesis, al fin.

A mi mujer Carolina, el sentido de mi vida, la razón de mi día a día, mi más profunda motivación, mi más feroz crítica y a la vez mi más ferviente admiradora. Ella ha sufrido más que nadie, todas las horas que le he robado para dedicar a la consecución de este trabajo. Mi compañera de viaje, participe de mis éxitos y mis fracasos, siempre a mi lado. Gracias Caro.

Declaración de conflictos de interés

Declaro no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

La presente tesis no ha generado ninguna patente.

Este trabajo ha sido financiado íntegramente por el proyecto de investigación en salud PI13/02382 financiado por el Instituto de Salud Carlos III al Prof Dr Federico Martín Torres entre los años 2014-2016

Durante el transcurso de la tesis he recibido pagos de la empresa Merck Sharp & Dohme, GlaxoSmithkline y Pfizer en concepto de asesorías científicas, no relacionadas con el contenido de la tesis.



1 Tabla de contenido

1	INTRODUCCIÓN	11
1.1	ROTAVIRUS: CARACTERÍSTICAS Y DESCRIPCIÓN	11
1.2	CARACTERIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD POR ROTAVIRUS	13
1.2.1	<i>Fisiopatogenia</i>	13
1.2.2	<i>Anclaje del rotavirus a la membrana celular: susceptibilidad genética a la infección</i>	17
1.3	EPIDEMIOLOGÍA Y CARGA DE LA ENFERMEDAD	19
1.3.1	<i>Carga de la enfermedad por Rotavirus en Europa y en España</i>	21
1.4	VACUNAS FRENTE AL ROTAVIRUS	24
1.4.1	<i>Primeras estrategias</i>	24
1.4.2	<i>Vacunas actuales frente a Rotavirus</i>	25
1.4.3	<i>Nuevos candidatos vacunales</i>	27
1.5	LA RESPUESTA INMUNE FRENTE AL ROTAVIRUS	29
1.5.1	<i>Respuesta inmune innata en humanos tras la infección por rotavirus</i>	29
1.5.2	<i>Papel de las citocinas en la defensa frente al rotavirus</i>	31
1.5.3	<i>Acción de las células inmunes innatas en la infección</i>	32
1.5.4	<i>Respuesta inmune humoral tras la infección por rotavirus</i>	34
1.5.5	<i>Respuesta inmune celular</i>	35
1.5.6	<i>Respuesta inmune tras la vacunación</i>	36
1.6	CORRELATOS DE PROTECCIÓN PARA LAS VACUNAS FRENTE A ROTAVIRUS	38
1.6.1	<i>RV-sIgA como correlato de protección</i>	39
1.6.2	<i>Nuevos correlatos de protección alternativos</i>	42
1.6.3	<i>Anticuerpos secretores frente a rotavirus (RV-SIg)</i>	42
1.6.4	<i>Células B memoria y células plasmáticas específicas de rotavirus</i>	43
1.6.5	<i>Células T específicas frente a rotavirus</i>	43
1.7	ORGANIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA MUCOSA INTESTINAL	45
1.7.1	<i>El sistema inmune de la mucosa (MALT)</i>	46
1.7.2	<i>Los diferentes sistemas MALT y la comunicación entre ellos</i>	47
1.8	ROTAVIRUS COMO ENFERMEDAD SISTÉMICA: "ROTAVOLUTION"	51
2	JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS	54
3	OBJETIVOS	56
4	MATERIAL Y MÉTODOS	57
4.1	SUJETOS DEL ESTUDIO	57
4.1.1	<i>Criterios de inclusión y exclusión en el estudio</i>	57
4.2	MUESTRAS RECOGIDAS PARA EL ESTUDIO	59
4.3	VACUNA EMPLEADA DURANTE EL ESTUDIO	60
4.4	ANTÍGENOS DE ROTAVIRUS EMPLEADOS ENSAYO ESTIMULACIÓN IN VITRO	60
4.5	PROCEDIMIENTOS REALIZADOS DURANTE EL ESTUDIO	61
4.5.1	<i>Extracción de ARN y preparación de la muestra</i>	61
4.5.2	<i>Análisis transcriptómico mediante ARN-Seq</i>	61
4.5.3	<i>Determinación de RV-IgA en muestras de suero y saliva mediante ELISA directo</i>	65
4.5.4	<i>Determinación por multiplexado de citocinas en suero y saliva mediante xMAP-Luminex®</i>	66
4.5.5	<i>Evaluación de la respuesta inmune celular mediante ensayo de estimulación en sangre completa (WBS, whole blood stimulation assay)</i>	68
4.5.6	<i>Criopreservación de sangre completa</i>	69
4.5.7	<i>Análisis de expresión de marcadores de activación en superficie celular mediante citometría de flujo</i>	69
4.5.8	<i>Inmunoblotting sobre electroforesis bidimensional de proteínas de rotavirus</i>	70
4.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
5	RESULTADOS	75
5.1	ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL EN LA MUCOSA ORAL EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN NATURAL Y EN LA VACUNACIÓN: COMPARACIÓN CON LA RESPUESTA SISTÉMICA	75
5.1.1	<i>Análisis de RV-IgA en muestras de suero/saliva en la cohorte de pacientes infectados</i>	75

5.1.2	<i>Análisis de RV-IgA en muestras de suero/saliva en la cohorte de pacientes vacunados.</i>	77
5.1.3	<i>Análisis de la influencia de la lactancia sobre la inmunogenicidad de la vacunación y el GMFR</i>	83
5.1.4	<i>Comparación entre las cohortes de individuos vacunados e infectados.</i>	85
5.1.5	<i>Correlación entre las muestras de saliva y suero en ambas cohortes.</i>	87
5.2	ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE CITOCINAS EN MUCOSA ORAL ENTRE EL PACIENTE VACUNADO E INFECTADO: COMPARACIÓN CON LA RESPUESTA SISTÉMICA.	89
5.2.1	Perfil de citocinas en suero y saliva en la cohorte de pacientes infectados	89
5.2.2	<i>Perfil de citocinas en suero y saliva en la cohorte de pacientes vacunados.</i>	92
5.2.3	<i>Análisis comparativo entre el perfil de citocinas de la cohorte de pacientes infectados y vacunados.</i>	95
5.2.4	<i>Correlación entre los valores de citocinas obtenidos y el curso clínico de los pacientes infectados.</i>	98
5.3	ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR A DIFERENTES ANTÍGENOS DE ROTAVIRUS EN AMBAS COHORTES	104
5.3.1	<i>Respuesta inmune celular a antígenos de rotavirus en la cohorte de pacientes infectados</i>	104
5.3.2	<i>Respuesta inmune celular a antígenos de rotavirus en la cohorte de pacientes vacunados.</i>	106
5.3.3	<i>Comparación de la respuesta inmune celular obtenida entre la cohorte de pacientes infectados y vacunados.</i>	112
5.3.4	<i>Correlación de la respuesta inmune celular con el curso clínico en la cohorte de pacientes infectados.</i>	114
5.3.5	<i>Correlación entre la inmunidad celular y la inmunidad humoral en la cohorte de pacientes vacunados.</i>	116
5.4	ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS PERFILES MOLECULARES DE INMUNIZACIÓN HUMORAL EN EL SUERO TRAS LA INFECCIÓN NATURAL Y TRAS LA VACUNACIÓN	118
5.5	ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA EN EL PACIENTE INFECTADO Y VACUNADO	121
5.5.1	<i>Análisis del transcriptoma en el paciente infectado vs grupo control</i>	121
5.5.2	<i>Análisis del transcriptoma en el paciente vacunado vs grupo control.</i>	135
5.6	CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR TRAS LA INFECCIÓN Y TRAS LA VACUNACIÓN DE ROTAVIRUS	136
5.6.1	<i>Caracterización de la respuesta celular durante la fase aguda de la infección por rotavirus.</i>	136
5.6.2	<i>Caracterización de la respuesta celular tras la vacunación frente al rotavirus.</i>	138
6	DISCUSIÓN	140
6.1	ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL EN LA MUCOSA ORAL EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN NATURAL Y A LA VACUNACIÓN	140
6.1.1	<i>Rotavirus-IgA salivar como correlato de protección alternativo</i>	141
6.1.2	<i>Interferencia de la lactancia materna en el cálculo de la conversión</i>	142
6.1.3	<i>Diferencias en los niveles de anticuerpos alcanzados mediante la infección natural y la vacunación</i>	144
6.1.4	<i>Correlación entre los compartimentos sérico y mucosa oral</i>	145
6.2	RESPUESTA DE CITOCINAS EN SUERO Y EN MUCOSA ORAL TRAS LA INFECCIÓN NATURAL DE ROTAVIRUS Y TRAS LA VACUNACIÓN	146
6.2.1	Respuesta inmune mediada por citocinas en respuesta a la infección por rotavirus en mucosa oral	146
6.2.2	<i>Respuesta inmune mediada por citocinas en respuesta a la vacunación</i>	153
6.2.3	<i>Comparación entre la respuesta de citocinas en la infección natural y tras la vacunación</i>	154
6.2.4	<i>Comparación entre la respuesta de citocinas en suero y saliva</i>	155
6.3	ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR A DIFERENTES ANTÍGENOS DE ROTAVIRUS EN AMBAS COHORTES	156
6.3.1	<i>Respuesta inmune celular en el paciente infectado</i>	156
6.3.2	<i>Respuesta inmune celular en el paciente vacunado</i>	157
6.3.3	<i>Cambios en el perfil de citocinas tras la vacunación</i>	158
6.3.4	<i>Comparación de la respuesta entre ambas cohortes</i>	159

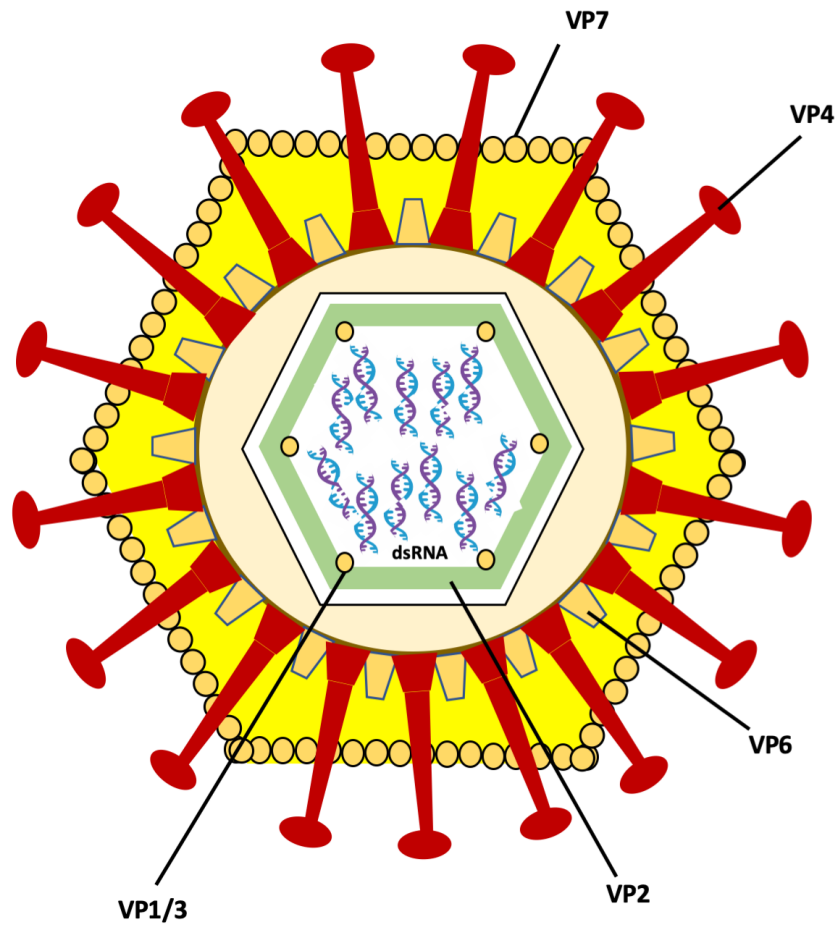
6.3.5	<i>Asociación entre la respuesta mediada por citocinas y el curso clínico de la enfermedad</i>	161
6.3.6	<i>Correlación entre la inmunidad celular y la inmunidad humoral en el paciente vacunado.....</i>	162
6.4	ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS PERFILES MOLECULARES DE INMUNIZACIÓN HUMORAL TRAS LA INFECCIÓN NATURAL Y TRAS LA VACUNACIÓN.....	163
6.5	ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA EN EL PACIENTE INFECTADO Y VACUNADO.....	166
6.5.1	<i>Análisis global del transcriptoma en el paciente infectado</i>	166
6.5.2	<i>Análisis centrado en genes de respuesta inmune.....</i>	169
6.5.3	<i>Análisis global del transcriptoma en el paciente vacunado.....</i>	173
6.6	CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR TRAS LA INFECCIÓN Y LA VACUNACIÓN	174
7	CONCLUSIONES	176
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	179
9	ANEXO: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS	181
10	BIBLIOGRAFÍA.....	185



1 INTRODUCCIÓN

1.1 ROTAVIRUS: CARACTERÍSTICAS Y DESCRIPCIÓN

Los rotavirus comprenden un género propio dentro de la familiar Reoviridae. Son virus ARN complejos no envueltos formados por una estructura de cápside alrededor de 11 segmentos helicoidales de ARN doble cadena, que se corresponden con los genes virales. Los rotavirus están compuestos por seis proteínas estructurales (VP1-6) y seis proteínas no estructurales (NSP1-6), codificadas cada una en un segmento génico único excepto para las proteínas no estructurales 5 y 6 (NSP5 y NSP6) que codifican en regiones solapantes del mismo segmento (1). Los rotavirus se dividen en siete grupos serológicos designados como A, B, C, D, E, F y G. El ser humano solo se infecta principalmente por el tipo A, aunque también puede verse infectado por el B y el C (2). Todos los grupos tienen capacidad para infectar a los animales. Dentro del tipo A hay diferentes serotipos que se clasifican en función de dos proteínas de la cápside. La proteína VP7 define el tipo G y la proteína VP4 define el tipo P (3)



Protein	Molecular weight (Kdal)	Location	Function
VP1	125	Vertices of inner capsid	RNA-dependent RNA polymerase
VP2	102	Inner capsid	RNA binding
VP3	88	Vertices of inner capsid	Viral mRNA capping enzyme
VP4	87	Outer capsid	Spike protein, cell attachment
NSP1	59	Nonstructural	Antagonist of host IFN response
VP6	45	Intermediate capsid	Structural
NSP2	37	Nonstructural	NTPase and RNA-binding; formation of viroplasm
NSP3	35	Nonstructural	Facilitate translation of rotaviral mRNA transcripts and shut-off of cellular protein synthesis
VP7	34	Outer capsid	Structural and neutralizing antigen
NSP4	20	Nonstructural	Intracellular receptor for newly viral particles; Enterotoxin
NSP5	22	Nonstructural	Binding partner of NSP2 in the formation of viroplasm
NPS6	22	Nonstructural	Viral genome replication and packaging

Figura 1: Estructura de los Rotavirus. Cápside viral no envuelta formada por seis proteínas estructurales (VP1-6) y seis proteínas no estructurales (NSP1-6) que rodea a los 11 segmentos de ARN viral. Imagen obtenida de Gomez-Rial et al Rotavirus and autoimmunity Journal of Infection 2020

En la **Figura 1** se detalla la estructura de la partícula del rotavirus: hay tres proteínas virales estructurales (VP4, 6 y 7) y una proteína no estructural (NSP4) que son factores importantes en la infectividad, patogenicidad e inmunogenicidad del virus (4). La proteína viral VP4 se proyecta desde la cápside y permite la unión a su receptor en el enterocito, paso clave en la infección de la célula huésped (5). La infección por rotavirus requiere la acción de una proteasa nativa del intestino del huésped. Dicha proteasa altera la estructura de la proteína **VP4** resultando en dos nuevas proteínas de superficie denominadas **VP5** y **VP8**, que son las responsables de iniciar la infección (6) La proteína viral VP6 constituye la proteína de cápside primaria y actúa como potente antígeno, clave como marcador diagnóstico y en la identificación de las diferentes especies de rotavirus (7, 8) La proteína viral **VP7** es una glicoproteína localizada en la superficie externa del virus y constituye otro importante antígeno, altamente inmunogénico y responsable de la memoria a largo plazo (9) La proteína no estructural **NSP4** es una enterotoxina y es la principal responsable de la patogenicidad de la infección dado que es un importante estimulador de la diarrea producida durante la infección (10, 11).

1.2 CARACTERIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD POR ROTAVIRUS

1.2.1 Fisiopatogenia

Los rotavirus se replican preferentemente en los enterocitos maduros situados en los extremos de las vellosidades del intestino delgado. Los modelos animales muestran que la infección por rotavirus no se asocia con grandes lesiones, sino

que se producen ligeras lesiones como vacuolización de enterocitos o como mucha hiperplasia de las criptas intestinales. La inflamación es generalmente suave en comparación con las infecciones intestinales (12-14) Además, estos modelos animales sugieren la ausencia de correlación entre la lesión histológica y los síntomas de la enfermedad. La infección por rotavirus altera la función del epitelio del intestino delgado, resultando en diarrea (15)

La diarrea generalmente se considera malabsortiva, secundaria a la destrucción de los enterocitos. El proceso que conduce a la diarrea se inicia cuando el rotavirus se une e infecta a los enterocitos del intestino delgado. El virus es internalizado mediante un mecanismo desconocido, pierde la cápside externa y activa las transcriptasas virales y la síntesis de moléculas virales. Las proteínas virales y el ARN viral se concentra en los viroplasmos en el citoplasma del enterocito (14). Estos eventos intracelulares junto con la acción de la enterotoxina NSP4 produce la liberación de Ca^{++} desde el interior del retículo endoplasmático. El incremento en el Ca^{++} intracelular activa diferentes procesos celulares entre los que se incluye la destrucción de la red de citoesqueleto de las microvellosidades y el descenso en la expresión de enzimas como disacaridasas en el extremo apical de las vellosidades, lo que lleva a la inhibición del sistema de co-transporte de Na^+ y a la necrosis. Estos acontecimientos conducen al componente de malabsorción de la diarrea a través de la reducción de la capacidad absorbente del epitelio y la reducción de la expresión de enzimas digestivas en la superficie epitelial (**Figura 2A**)(14)

Dicha malabsorción resulta en el tránsito de carbohidratos, grasas y proteínas sin digerir hacia el colón. Este *bolus* sin digerir es osmóticamente activo y el colón no es capaz de absorber suficiente agua, lo que conduce a una diarrea osmótica.

La liberación de la proteína no estructural NSP4 desde las células infectadas permite tener efectos paracrinos sobre las células no infectadas. Esta proteína actúa en modo similar a una toxina y se une a las células no infectadas a través de receptores sin identificar activando la cascada Fosfolipasa C – Inositol 1,3,5-trifosfato (PLC-IP₃) que culmina en la liberación de Ca⁺⁺ intracelular desde el retículo endoplasmático (16), aumentando la concentración de Ca⁺⁺ intracelular (17) (**Figura 2A**). Esta enterotoxina NSP4 parece también estimular en sistema nervioso entérico (SNE) (18, 19) como se demuestra experimentalmente mediante agentes que bloquean el SNE en la infección por rotavirus (**Figura 2B-C**). Este modo de acción explicaría el mecanismo por el cual con relativamente pocas células infectadas y poco daño visible en la mucosa se puede desarrollar la respuesta en forma de diarrea.

Por tanto, parece claro que la diarrea producida por la infección por rotavirus tiene un componente multifactorial resultado tanto del efecto directo del virus como de efectos indirectos de la infección y la respuesta del huésped (13, 15).

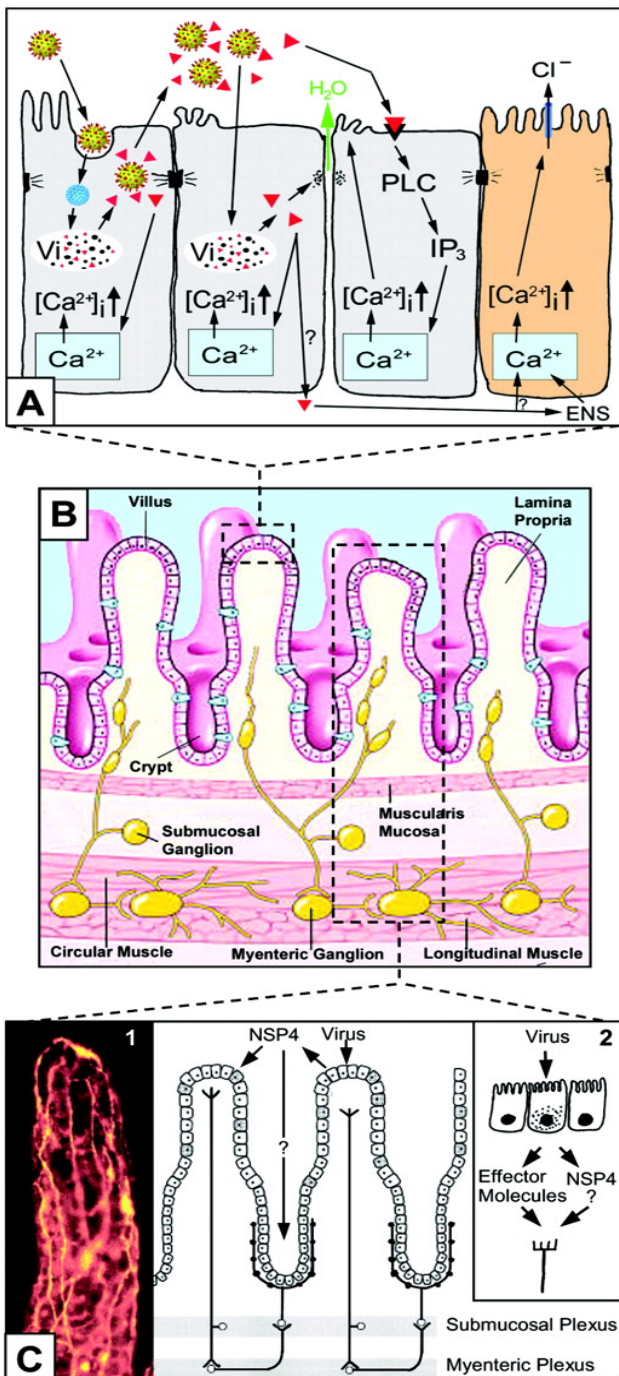


Figura 2: Modelo de diarrea inducida por rotavirus (De Robert F. Raming *J Virol*, 2004 Vol 78 Nº 19)

- A. La célula epitelial es infectada por el virus presente en el lumen intestinal, se produce la decapsidación viral y la formación del viroplasma (Vi) y la liberación del virus y las proteínas virales. La enterotoxina NSP4 (triángulo rojo) podría ser liberada a través de una vía secretora no habitual. La liberación de NSP4 en el interior de la célula produce liberación del Ca^{++} desde sus compartimentos internos, principalmente el retículo endoplasmático, aumentando la concentración de Ca^{++} intracelular. También la enterotoxina NSP4 liberada durante la infección interacciona con las uniones estrechas intercelulares, permitiendo la salida de agua y electrolitos entre las células (flecha verde) NSP4 se une a su receptor específico en la célula y activa una cascada de señalización a través de la PLC e IP_3 que resulta en la liberación de Ca^{++} y aumento de su concentración intracelular. Este incremento produce la desorganización del citoesqueleto de las microvellosidades y finalmente secreción de iones como el Cl^- hacia el exterior.
- B. Se muestra la arquitectura normal del intestino delgado con el sistema nervioso entérico y el sistema ganglionar en los diferentes niveles de la submucosa.
- C. Se muestra el arco reflejo en el que el sistema nervioso entérico (SNE) puede recibir señales del epitelio de las microvellosidades y activar el epitelio de las células de la cripta. La imagen 1 muestra las vellosidades teñidas para una proteína del sistema nervioso entérico que revela la gran inervación presente (tinción amarilla) La imagen 2 muestra que los enterocitos de las vellosidades infectados pueden estimular el SNE a través de la liberación basolateral de NSP4.

1.2.2 Anclaje del rotavirus a la membrana celular: susceptibilidad genética a la infección

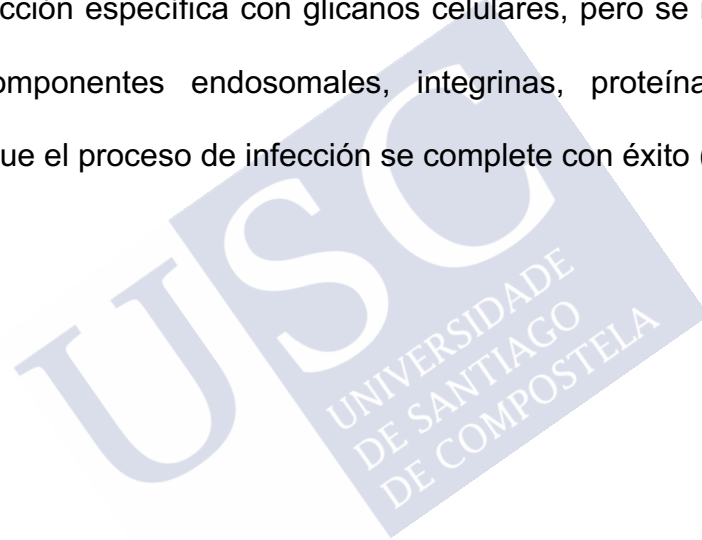
El rotavirus preferentemente infecta los enterocitos villosos terminalmente diferenciados de la parte superior del intestino delgado (20). El primer paso en el proceso de infección es la digestión de la partícula viral mediada por proteasas similares a tripsina localizadas en el lumen intestinal del huésped (21, 22). Durante este paso de activación se produce la ruptura de la proteína de cápside viral VP4 en dos fragmentos principales, VP8* por el extremo N-terminal y VP5* en el lado C-terminal (23, 24). Este procesamiento proteolítico es esencial para la infectividad del virus y permite un anclaje estable al epitelio de la mucosa intestinal (25).

Estudios recientes han identificado el ligando sobre la mucosa intestinal reconocido por esta molécula VP8* del rotavirus; se trata de oligosacáridos pertenecientes a los antígenos de grupo sanguíneo tisular (*HBGA, histo-blood group antigens*) (26-28). Estos carbohidratos HBGA similares a los antígenos Lewis y ABO se encuentran genéticamente determinados y están presentes en las células epiteliales intestinales, en las secreciones mucosas y en la superficie de los hematíes. Son, además, factor de anclaje para otros patógenos gastrointestinales como son *Helicobacter pilory* ó Norovirus (29)

Estos HBGA comparten un residuo común de α -1,2-Fucosa unido, añadido por el enzima α -1,2-fucosiltransferasa. Este enzima es codificado por el gen *FUT2* y determina un fenotipo “secretor” para estos antígenos HBGA. Los individuos

mutantes para *FUT2* son considerados “no-secretores” por carecer de esta actividad enzimática y por tanto ausentes de antígenos α -1,2-fucosilados en los tejidos de la mucosa. Estos individuos muestran una resistencia natural a la infección sintomática por rotavirus, demostrando ser un determinante de susceptibilidad importante al rotavirus (30).

Sin embargo, la entrada del rotavirus en la célula es un proceso complejo que implican varios pasos de anclaje a diferentes receptores. La proteína viral VP8* media la interacción específica con glicanos celulares, pero se requieren otros receptores (componentes endosomales, integrinas, proteínas de choque térmico) para que el proceso de infección se complete con éxito (31-33).



1.3 EPIDEMIOLOGÍA Y CARGA DE LA ENFERMEDAD

La infección por rotavirus es la causa de entre el 40-50% de las diarreas graves agudas en niños en todo el mundo (34, 35). A la edad de 5 años, el 95% de los niños habrán contraído la enfermedad y se muestran especialmente vulnerables los niños de entre 6 meses y dos años, aunque la infección por rotavirus puede afectar a cualquier edad del individuo (36, 37).

Los rotavirus son altamente contagiosos entre los niños. Es frecuente encontrar casos de infecciones repetidas con diferentes cepas virales, y muchos niños sufren varios episodios de infección por rotavirus en el primer año de vida. La primera infección tiende a ser la más severa y con las sucesivas infecciones el individuo adquiere inmunidad frente al virus (38).

Se reportan anualmente 114 millones de casos de infección por rotavirus en niños menores de 5 años en el mundo, de los cuales 24 millones de casos requieren visita al centro de salud y 2,3 millones de casos requieren de hospitalización (35). En el año 2013, la infección por rotavirus se asoció con aproximadamente 200.000 muertes en niños menores de 5 años en todo el mundo (39). Aunque la prevalencia de la infección por rotavirus es mundialmente similar (30-50%), >90% de la mortalidad se asocia a países en vías de desarrollo, debido fundamentalmente al limitado acceso a los servicios básicos de salud, falta de las terapias de hidratación necesarias y una mayor prevalencia de otras condiciones como la desnutrición (40).

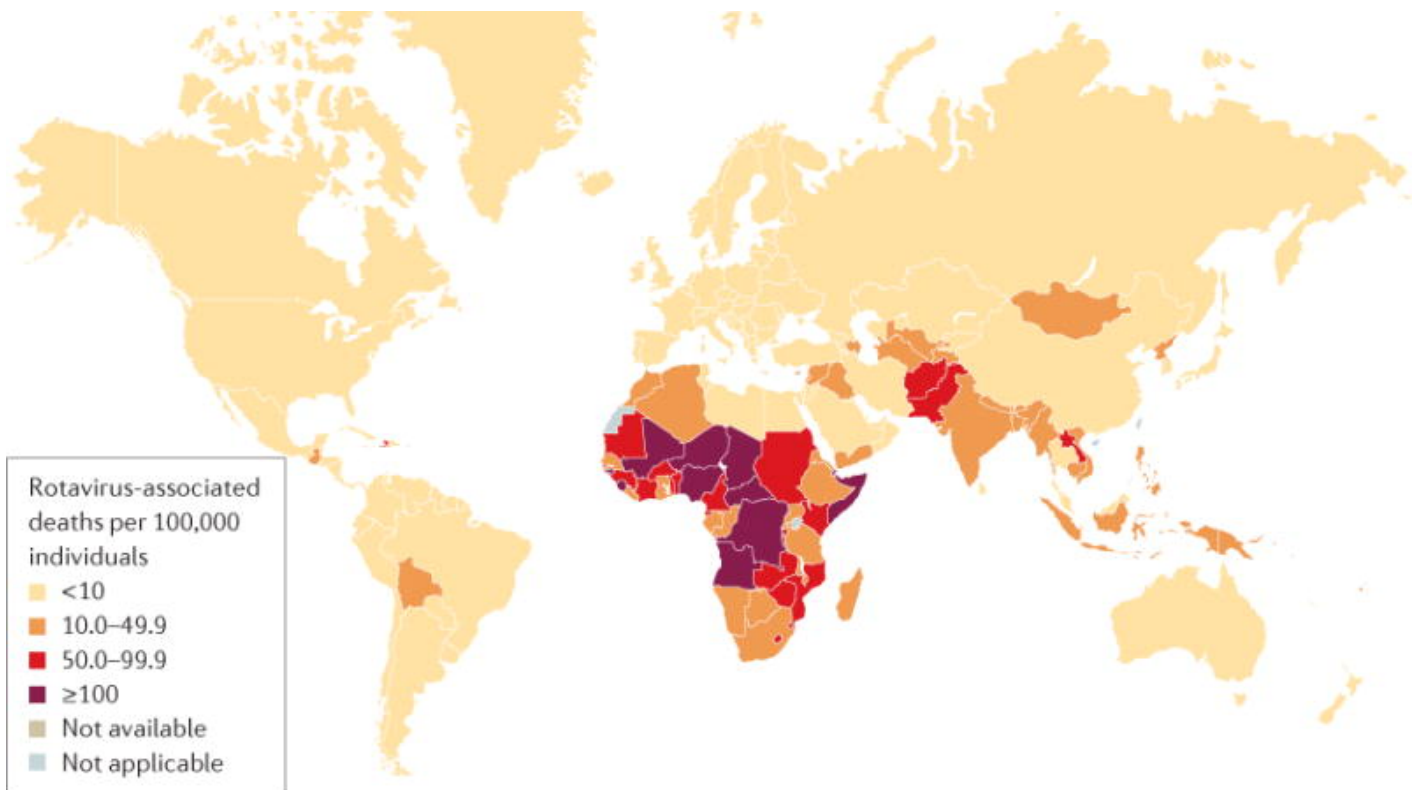


Figura 3: Mortalidad asociada a Rotavirus en niños menores de 5 años en el año 2013

La OMS estima que durante el año 2013, 215.000 niños menores de 5 años fallecieron a causa de una infección por rotavirus. Imagen obtenida de:

http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/rotavirus/rotavirus_deaths_map_b.jpg?ua=1

La infección por rotavirus se produce a edades más tempranas en los países en vías de desarrollo que en los países desarrollados, con tasas de hospitalización a los 8 meses de vida del 43% en África y 27% en Europa (40).

Además, la estacionalidad se correlaciona con el nivel de vida de los países, con mayor número de enfermedad estacional en países desarrollados que en países en vías de desarrollo (41).

1.3.1 Carga de la enfermedad por Rotavirus en Europa y en España

Las muertes por diarrea asociada a rotavirus ocurren con menos frecuencia en las regiones industrializadas como Europa. A pesar del bajo número de muertes anuales, la carga de la enfermedad por rotavirus es considerable, con más de 87.000 hospitalizaciones y casi 700.000 consultas en centros de salud en niños menores de 5 años en los países industrializados. En los países europeos la infección por rotavirus también produce muertes, con 231 niños anualmente (42).

Los rotavirus son la causa única más común de gastroenteritis en niños menores de 5 años de edad en Europa, donde es tres veces más probable la hospitalización que en gastroenteritis por otras causas (43)

En Europa, las infecciones nosocomiales adquiridas por rotavirus afectan aproximadamente al mismo número de niños que las infecciones adquiridas en comunidad (44), alcanzando la cifra de hasta el 40% de las diarreas nosocomiales adquiridas en Polonia, Austria y Francia (42, 45, 46). Estudios desarrollados en Francia e Italia demuestran que más del 15% de los niños muestran sintomatología de la enfermedad tras el alta hospitalaria (47, 48). Los costes asociados a la infección nosocomial son considerables y forman parte de los principales costes hospitalarios asociados a la enfermedad por rotavirus en la región europea (45).

En España, la carga de la enfermedad se considera elevada en relación con el resto de los países europeos (**Tabla 1**) con hasta 7 muertos al año, más de 7000 hospitalizaciones y más de 60.000 visitas a los centros de salud (42). Se estima

que el 31,6% de las admisiones hospitalarias por gastroenteritis son debidas al rotavirus con una tasa de hospitalización de 480 casos por cada 100.000 niños menor de 5 años y un coste hospitalario medio anual de 123.262 euros (49).



IMPACTO DE LA ENFERMEDAD DE ROTAVIRUS EN NIÑOS <5 AÑOS EN LA UNION EUROPEA

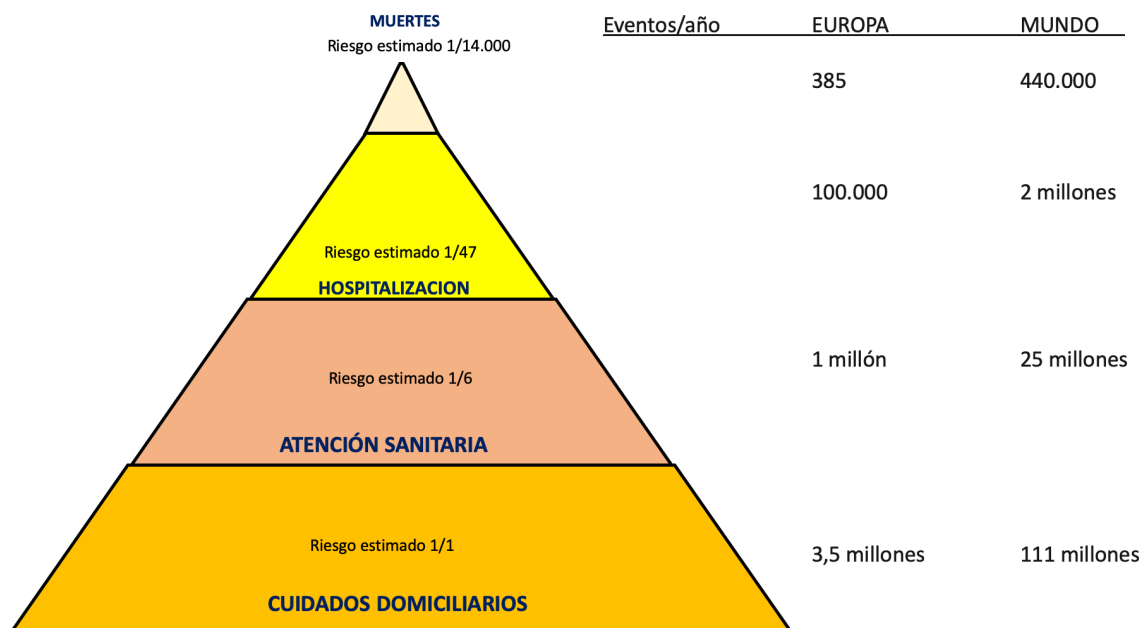


Figura 4: Carga de la enfermedad por rotavirus en Europa y el Mundo

La pirámide muestra el riesgo de sufrir la enfermedad por rotavirus de un niño antes de alcanzar los 5 años en la Unión Europea y su comparación con el resto del mundo (Datos obtenidos de Parashar UD et al Emerg Infect Dis 2003 9(5))

Country	Income Group	Home	Physician Visit	Hospitalizations	Deaths
Austria	1	44,887	11,222	1403	1
Belgium	1	67,423	16,856	2107	2
Cyprus	1	55,403	13,851	1731	0*
Czech Republic	2	5916	1479	185	14
Denmark	1	38,250	9563	1195	1
Estonia	2	7685	1921	240	3
Finland	1	33,501	8375	1047	1
France	1	455,902	113,975	14,247	14
Germany	1	434,340	108,585	13,573	13
Greece	1	60,481	15,120	1890	2
Hungary	2	57,209	14,302	1788	23
Ireland	1	36,374	9093	1137	1
Italy	1	321,700	80,425	10,053	11
Latvia	2	11,836	2959	370	7
Lithuania	2	17,731	4433	554	9
Luxembourg	1	3163	791	99	0
Malta	1	2249	562	70	0
The Netherlands	1	118,663	29,666	3708	4
Poland	2	207,480	51,870	6484	87
Portugal	1	66,565	16,641	2080	3
Slovakia	2	30,398	7599	950	13
Slovenia	1	10,225	2556	320	0
Spain	1	240,773	60,193	7524	7
Sweden	1	56,677	14,169	1771	1
United Kingdom	1	409,173	102,293	12,787	14
Total		2,794,003	698,501	87,313	231

Tabla 1: Incidencia anual de la enfermedad por rotavirus en niños menores de 5 años en Europa

1.4 VACUNAS FRENTE AL ROTAVIRUS

Desde el principio, el objetivo de la vacunación frente al rotavirus ha sido replicar el grado de protección frente a la enfermedad que sigue a la infección natural. Por tanto, los programas de vacunación se centraban en prevenir la enfermedad grave y/o moderada pero no necesariamente la enfermedad leve asociada con rotavirus.

1.4.1 Primeras estrategias

Las primeras investigaciones para desarrollar una vacuna frente a rotavirus segura y eficaz comenzó durante los años 70 cuando se demostró que infecciones previas con cepas de rotavirus animales generaban protección frente a infecciones experimentales con rotavirus humanos (50). De este modo, se desarrollaron tres vacunas frente a rotavirus no humanas, dos de ellas con cepas de rotavirus bovinas RIT4237 con una cepa G6P6 (51) y WC3 con G6P7 (52), y una cepa de rotavirus de simio Rhesus RRV con G3P3 (53). Todas estas vacunas demostraron una eficacia variable durante los ensayos clínicos, pero obtuvieron resultados particularmente decepcionantes en los países en vías de desarrollo (54, 55). En el año 2001, China introdujo una vacuna frente a rotavirus para inmunización de niños basada en una cepa atenuada de cordero G10P12 desarrollada y producida por el Instituto Lanzhou, aunque la eficacia y los resultados del ensayo clínico no son conocidos.

A la vista de los malos resultados obtenidos a partir de vacunas monovalentes basadas en cepas animales atenuadas, los esfuerzos se centraron en desarrollar cepas humanas atenuadas o cepas de rotavirus reasortantes animales-

humanas. La primera vacuna oral multivalente reasortante desarrollada fue **RotaShield™** (RRV-TV), una vacuna tetravalente que contenía una mezcla de cuatro cepas virales G1 a G4 con genes reasortantes humanos-rhesus (56). RRV-TV demostró alta eficacia frente a las formas graves-moderadas de la enfermedad (80-100%) en los ensayos clínicos desarrollados en EEUU, Finlandia y Venezuela (57-59), y fue licenciada en agosto de 1998 para su uso rutinario en EEUU (60).

Sin embargo, tras la inclusión de esta vacuna en el calendario de inmunización se reportaron varios casos de invaginación intestinal asociada a la vacuna (61) con mayor riesgo a los 3-10 días de la primera de las tres dosis (62). El riesgo de este efecto adverso de la vacuna se estimó en 1/10.000 niños vacunados (63) y hecho por el cual Rotashield™ fue retirado del mercado americano 14 meses tras su introducción y se detuvieron todos los ensayos que se estaban realizando en los demás países.

1.4.2 Vacunas actuales frente a Rotavirus

Actualmente existen cuatro vacunas frente a rotavirus licenciadas por la OMS: **Rotarix™** (GlaxoSmithKline, 2009), **RotaTeq™** (Merck & Co, 2008) **Rotavac™** (Bharat Biotech, 2018) y **ROTASIIL™** (Serum Institute of India, 2018). Sin embargo, las dos últimas en licenciarse Rotavac™ y Rotasiil™ actualmente solo se usan en India (ambas vacunas) y Palestina (Rotavac™). Adicionalmente, existen otras dos vacunas disponibles en el mercado privado nacional de

algunos países: Rotavin-M1 (Vietnam) y Lanzhou Lamb Rotavirus (LLR) en China (64).

Aunque se trata en todas ellas de vacunas orales vivas atenuadas, la estrategia de protección y la composición de estas vacunas varía sustancialmente. RotaTeq™ es una vacuna pentavalente humana-bovina reasortante en el gen VP7 a partir de serotipos G1, G2, G3 y G4 y en el gen VP4 a partir de serotipo P8, ambos genes de cepas de rotavirus humanos, y los restantes genes a partir de la cepa bovina WC3 (65). Su estrategia de protección se basa en la respuesta inmune protectora frente al antígeno VP7 (similar a Rotashield™) y añade el antígeno VP4, también considerado importante en la protección (66). En un ensayo clínico llevado a cabo en 11 países, se pudo por un lado, demostrar la seguridad de la vacuna con respecto a la invaginación intestinal comparando los resultados con un grupo sin vacunar, y por otro lado una gran eficacia en relación a la gravedad de la enfermedad y el número de hospitalizaciones por GEA rotavirus (74% GEA de cualquier gravedad y 98% GEA grave) (65, 67). La eficacia demostrada hacia los diferentes serotipos fue: G1 (75%), G2 (63%), G3 (83%), G4 (48%) y G9 (65%). RotaTeq™ fue licenciada en febrero del 2006 por la FDA para su uso en calendario en EEUU en un esquema de 3 dosis a los 2, 4 y 6 meses de edad (68). La primera dosis debe ser administrada entre los 6-12 semanas de edad y las dosis siguientes a intervalos de 4-10 semanas. El esquema de vacunación debe haberse terminado a las 32 semanas de edad en todo caso. A finales del año 2018, 23 países ya habían incluido RotaTeq™ en su programa nacional de inmunización (9 de ellos en convivencia con Rotarix™) de los 92 países que han introducido la vacuna frente a rotavirus en calendario (66).

Rotarix™ (GlaxoSmithKline) muestra una estrategia de protección diferente, dado que se trata de una vacuna monovalente compuesta por una sola cepa de rotavirus humana atenuada G1P8 (RIX4414) (69). Esta vacuna se administra en un esquema de 2 dosis a los 2 y 4 meses de edad e igualmente que la vacuna pentavalente mostró buenos datos de seguridad y eficacia en los ensayos clínicos llevados a cabo por todo el mundo. Los resultados mostraron una protección del 85% frente a los casos graves de la enfermedad y del 100% frente a los casos más graves. La eficacia por serotipos fue: del 92% para G1, del 88% para G3, G4, y G9 (88%), y no significativa y del 41% frente a G2 (41%). A finales del año 2018, 88 países habían incluido Rotarix™ en su programa nacional de inmunización (9 de ellos en convivencia con RotaTeq™) (66).

Rotavac™ (Bharat Biologicals, India) está formada por una sola cepa humana de rotavirus atenuada G9P11 y se administra en esquema de 3 dosis (70) Rotasiil™ (Serum Institute of India) consta en su formulación de cepas bovinas-humanas reasortantes e incluye los serotipos de rotavirus humanos G1, G2, G3, G4 y G9 (71).

1.4.3 Nuevos candidatos vacunales

Durante los últimos años se ha explorado como nuevos candidatos vacunales las cepas de rotavirus neonatales dado que la historia natural ha mostrado que las infecciones asintomáticas de neonatos reducen la frecuencia y gravedad posterior de las diarreas por rotavirus. Sin embargo, la primera cepa neonatal empleada como antígeno vacunal fracasó en su intento de proporcionar protección (72) Actualmente, hay en marcha un ensayo clínico para evaluar la

inmunogenicidad de una cepa humana neonatal G3P6 (RV3) desarrollada en Australia que ha mostrado buena tolerabilidad y seguridad en fases iniciales (73, 74) y que actualmente es el candidato en fases de desarrollo mas avanzado RV3-BB (BioFarma, Indonesia).

Otra estrategia de protección actualmente en desarrollo es la administración de vacunas frente a rotavirus parenterales. Entre las vacunas en desarrollo destaca la vacuna de rotavirus no-replicante (NRRV) con subunidades P2-VP8-P8 con buenos resultados de inmunogenicidad mostrados hasta la fecha (75) Mas recientemente, una vacuna de subunidades trivalente (VAC041 con P2-VP8-P4P6P8) se está desarrollando. También existe una vacuna basada en la subunidad VP6 que incorpora partículas virales similares a norovirus para formar una vacuna rotavirus-norovirus combinada que ha mostrado buenos resultados en modelos animales (76) También se ha ensayado una vacuna frente a rotavirus inactivada (IRV) basado en una cepa G1P8 que ha demostrado una potente respuesta de anticuerpos neutralizantes heterotipicos (77).

1.5 LA RESPUESTA INMUNE FRENTE AL ROTAVIRUS

Tras la infección natural por rotavirus o tras la vacunación, el sistema inmune genera una respuesta innata (no específica) y adquirida específica frente al virus (celular y humoral) Sin embargo y a pesar de que las vacunas actuales frente al rotavirus son altamente efectivas frente al desarrollo de enfermedad grave, los mecanismos moleculares de protección son solo parcialmente conocidos (78-80) por lo que no se han podido establecer hasta la fecha correlatos de protección absolutos para las vacunas (81).

1.5.1 Respuesta inmune innata en humanos tras la infección por rotavirus

Múltiples evidencias científicas muestran que la respuesta inmune innata es crítica como primera línea de defensa limitando la replicación del rotavirus (79, 82-84).

Los **interferones (IFN) tipo 1**, donde se incluyen las isoformas IFN- α e IFN- β , y **tipo 3**, donde se incluyen los IFN- λ 1 (IL-29), - λ 2 (IL-28A) e - λ 3 (IL-28B), son componentes clave en la defensa del huésped frente a todas las infecciones virales y también frente a la infección por rotavirus (85) Las células epiteliales intestinales cuentan con unos sensores citoplasmáticos de ARN viral del tipo RIG-I (*retinoic acid-inducible gene-1*) y MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) que contribuyen al reconocimiento del rotavirus e inducen la liberación de los IFNs (82, 86) No está muy claro como se produce la detección del ARN bicatenario de rotavirus durante la infección, dado que es sintetizado en el interior de partículas virales de doble capa (87) por lo que la identidad de las moléculas activadoras de RIG-I y MDA5 durante la infección por rotavirus se

encuentra aún por establecer (85) Otro tipo de receptor citoplasmático frente a ARN virales, los receptores tipo toll-3 (TLR-3) parecen tener un papel en la defensa frente al rotavirus en animales adultos, pero no en recién nacidos, algo que es consistente con el aumento de la expresión de los TLR3 con la edad (83) **(Figura 5)**.

Sin embargo, los rotavirus han desarrollado una estrategia para limitar la expresión de los IFN tipo I/III en la célula infectada, a través de uno de sus componentes, la proteína no estructural 1 (NSP1), que bloquean las proteínas de respuesta a IFN (*IRF, interferon response factors*) IRF3,5,7 (88-90) Esta capacidad de bloquear la expresión de los IFN se encuentran bien conservada entre las diferentes cepas de rotavirus, aunque el subtipo de IRF puede variar (91) **(Figura 5)** A pesar de esta capacidad de la proteína NSP1 de rotavirus en mediar la degradación de los IRFs, varios estudios han demostrado que los IFN- α/β aún son expresados en cantidades importantes durante la infección y niveles elevados en suero pueden ser detectados en niños con GEA por rotavirus (92, 93) Este hecho demuestra que aunque rotavirus puede alterar la expresión de IFN, aún se produce cantidad suficiente para impactar sobre la replicación viral, probablemente secretado por células epiteliales intestinales o células dendríticas durante la infección (94) Otro mecanismo de reducción del impacto del IFN es a través de la inhibición de su señalización mediante la acumulación nuclear de moléculas STAT1/2 (*signal transducer activator of transcription 1/2*) (95) **(Figura 5)**.

Sin embargo, aunque la inducción del IFN es requerido para reducir la carga de rotavirus, la ausencia de señalización por IFN no aumenta el tiempo de aclaramiento viral. Además, la respuesta inmune de IgA intestinal se produce igualmente en modelos animales deficientes en STAT1, sugiriendo que la vía del IFN no se requiere para activar la respuesta inmune adaptativa frente al rotavirus (82, 96).

1.5.2 Papel de las citocinas en la defensa frente al rotavirus

Además de la acción del IFN, la inducción de numerosas citocinas es una parte importante de la respuesta inmune innata frente al rotavirus. Estudios iniciales en modelos de infección empleando líneas de células epiteliales intestinales mostraban una robusta inducción de la interleucina 8 (IL-8) tras la infección por rotavirus (97) a través de la activación del factor nuclear kappa-beta (NFKB) (98). La IL-8 actúa como potente factor quimiotáctico atrayendo neutrófilos al lugar de infección, aunque se desconoce exactamente el papel de estas células inflamatorias en el aclaramiento del rotavirus en los lugares de infección (99). Además de IL-8, otras citocinas y quimiocinas han sido detectadas tras la infección por rotavirus, entre las que se encuentran RANTES, GM-CSF, GRO- α , MIP1 β e IP-10 (100, 101). El papel de estas citocinas es atraer al lugar de la infección varios tipos celulares inmunes como células T, células dendríticas y monocitos, aunque se desconoce la importancia relativa de estas citocinas en la respuesta inmune a rotavirus (102).

Dada la importancia de la activación del factor NFKB en la inducción de citocinas, los rotavirus al igual que otros virus, han desarrollado estrategias para limitar su

activación a través de la proteína viral NSP1 (103). En este sentido, la cepa de rotavirus humana Wa es muy eficiente bloqueando la translocación nuclear del NF κ B (95) y limitando de este modo la inducción de varios tipos de IFN (91).

1.5.3 Acción de las células inmunes innatas en la infección

Las **células dendríticas** han demostrado su importancia para resolver la infección por rotavirus y la protección frente a la re-infección en modelos murinos (104, 105). Tras la activación y maduración de las células dendríticas, éstas migran a las placas de Peyer intestinales y muestran signos de activación e inducción de citocinas (106). La activación de las células dendríticas se realiza tras detección del ARN viral por el receptor endosomal TLR7 que induce la expresión de IFN- α/β (107) Sin embargo aun no se ha determinado que subtipo de células dendríticas son importantes en controlar la replicación del rotavirus durante la infección in vivo.

Además de estas células dendríticas, otras células fagocíticas, los **macrófagos** juegan un papel importante en el aclaramiento de la infección, aunque su papel exacto no ha sido aún esclarecido (108).

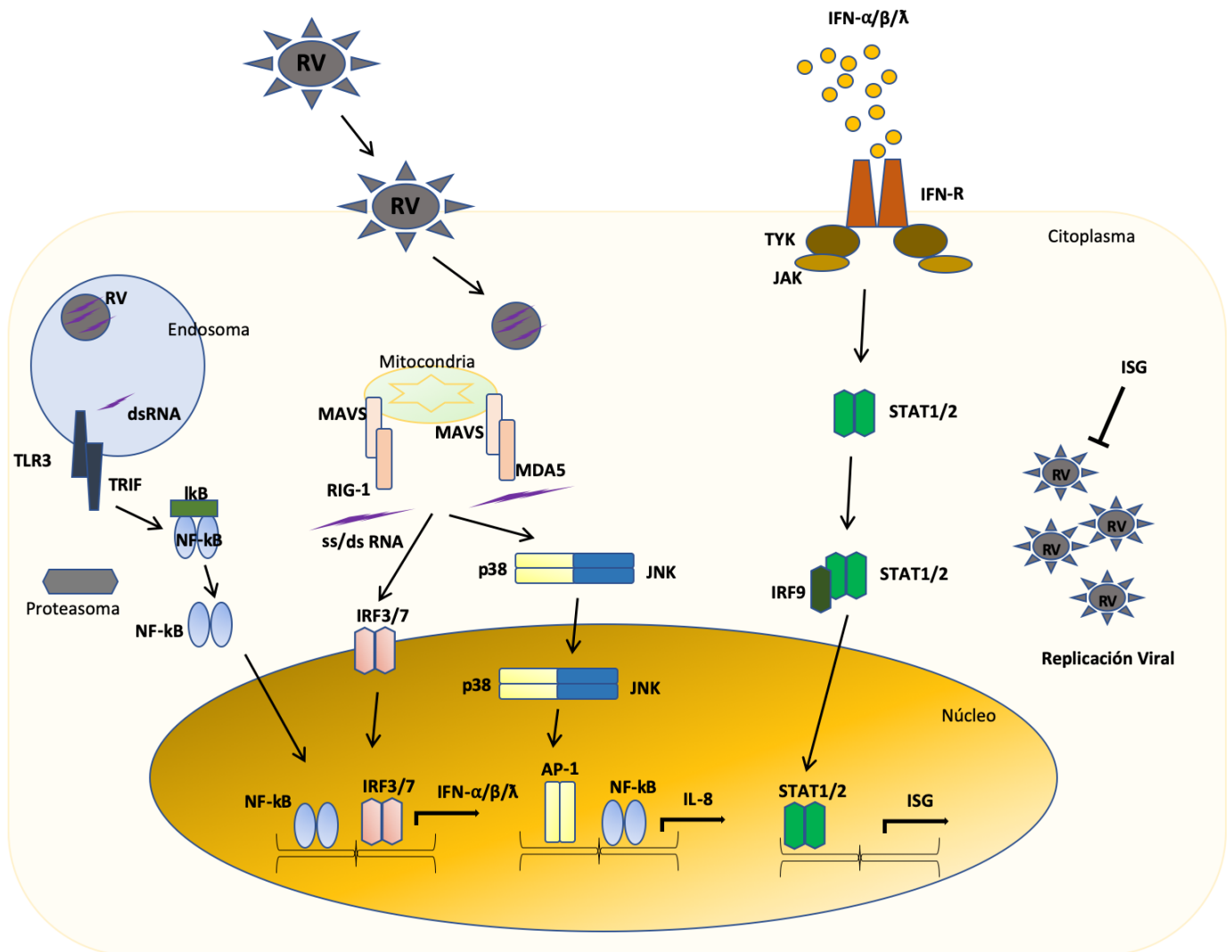


Figura 5: Detección de la infección por rotavirus e inducción de la respuesta inmune innata en las células epiteliales intestinales. Tras la entrada del RV en la célula, los sensores MDA5 y RIG-I detectan ARN viral y a través de proteínas mitocondriales de señalización antiviral (MAVS) inducen la activación de los factores de respuesta a IFN (IRF3/7) y la expresión de IFN- α/β . La infección por rotavirus también activa el factor de transcripción NF-kB. Todos estos factores de transcripción se trasladan al núcleo donde induce la expresión de IFN y otras citocinas como IL-8. Se ha descrito también una vía alternativa de detección del rotavirus a través de TLR3 y su adaptador TRIF que conduce a la activación de IRF3/7 e inducción de IFN. Los efectos protectores del IFN están mediados por activación de la vía STAT1/2 y activación de los genes estimulados por IFN (ISG) e inhibición de la replicación del rotavirus a través de un mecanismo desconocido. La liberación de citocinas produce el reclutamiento de otras células inmunitarias al lugar de la infección. La proteína de rotavirus NSP1 puede interferir con la respuesta del IFN, degradando los factores IRF3/7. También algunos rotavirus inhiben la activación del factor NF-kB a través de la degradación mediada por NSP1 de factores asociados a NF-kB. La infección por rotavirus previene la acumulación nuclear de las moléculas activadas STAT1/2 a través de un componente viral no identificado.

1.5.4 Respuesta inmune humoral tras la infección por rotavirus

En uno de los trabajos más importantes realizados hasta la fecha, Velázquez (37) en un seguimiento realizado durante 2 años a 200 niños sanos, estudió la respuesta inmune asociada a la infección por rotavirus. Según este trabajo, la primera infección por rotavirus típicamente resultaba en una GEA, sin embargo, la protección desarrollada frente a infecciones posteriores de rotavirus, el riesgo de desarrollar enfermedad descendía progresivamente, de forma que tras dos infecciones no se observaba enfermedad moderada o grave.

Las infecciones sintomáticas o asintomáticas conferían grados similares de protección (37, 109), resaltando la importancia de la infección asintomática por rotavirus en la protección frente al rotavirus (110). La inmunidad tras infección neonatal no confería protección pero en algunos casos evitaba el desarrollo de enfermedad grave (111).

La primera evidencia de que la protección frente al rotavirus era específica de serotipo y se relacionaba con los niveles de anticuerpos neutralizantes homotípicos del virus provinieron de los estudios de Chiba et al (112). Otros estudios posteriores sugirieron que la inmunidad humoral frente al rotavirus se correlacionaba con protección (113, 114). Tras la primera infección por rotavirus en niños se encontraban respuestas de anticuerpos neutralizantes homotípicas y heterotípicas, lo que sugería la presencia de epítomos neutralizantes crossreactivos (78, 115). Aquellos niños con respuestas heterotípicas tendían a ser de mayor edad y tenían anticuerpos frente a rotavirus pre-existentes (112).

Posteriormente se investigó en muestras de heces la presencia de anticuerpos IgA específicos frente a rotavirus y se demostró que a niveles altos correlacionaba muy bien con protección (116, 117). Los anticuerpos IgA séricos específicos frente a rotavirus también mostraban actividad neutralizante y reaccionaban con epítomos que inducían protección heterotípica (118).

Los anticuerpos maternos adquiridos transplacentariamente podían conferir cierto nivel de protección frente al rotavirus en los primeros meses de vida (119). La lactancia materna proporciona protección pasiva a través de mecanismos más allá de los anticuerpos (120, 121).

Sin embargo, a pesar de la importancia de las respuesta inmunes específicas frente a rotavirus, la protección tras la infección natural no necesariamente se correlaciona con la presencia de anticuerpos neutralizantes serotipo-específicos (122). Las proteínas de rotavirus VP2 y VP6 aunque no generan anticuerpos neutralizantes portan epítomos inmunodominantes y se han encontrado anticuerpos dirigidos frente a estos antígenos en muestras de sueros de individuos convalecientes (123), así como anticuerpos frente a NSP2 y NSP4 (124-126). El significado clínico de estos anticuerpos específicos no-neutralizantes es desconocido.

1.5.5 Respuesta inmune celular

La infección natural por rotavirus no es gran inductora de la secreción de citocinas ni de células CD8+ específicas frente al virus (127) aunque estas células pueden detectarse en circulación en la mayoría de los adultos (128). Del

mismo modo se detectan células CD4+ específicas frente a rotavirus circulantes en muestras de sangre de niños en la fase de convalecencia (129) Las células dendríticas han demostrado tener capacidad de secretar citocinas Th1 tras la infección por rotavirus (106) aunque son menos eficientes en la presentación de antígenos en individuos jóvenes que en adultos (127). El papel de las respuestas inmunes mediadas por células en la protección frente a la infección por rotavirus en humanos está aun por clarificar (78).

1.5.6 Respuesta inmune tras la vacunación

La inmunidad heteróloga desarrollada en terneros tras la vacunación con cepas de rotavirus bovinas frente a cepas humanas constituyó la base para el uso de cepas bovinas como los primeros candidatos vacunales humanos frente a rotavirus (130, 131) Aunque esta cepa de virus bovina no compartía epítomos neutralizantes con las cepas humanas conocidas, inducía una potente respuesta protectora heterotípica (132) Posteriormente se demostró que no solo los niveles de anticuerpos neutralizantes frente a rotavirus representaban el correlato de protección y se desarrollaron otros conceptos diferentes de vacunación basándose en vacunas reasortantes multivalentes que contenían moléculas de VP4 y VP7 representativas de las cepas humanas circulantes (base para las vacunas RotaShield™ y RotaTeq™) (65, 131). En contraste, la vacuna monovalente de serotipo G1P8 único (Rotarix™) se desarrolló en base a la generación de la respuesta inmune heterotípica producida en el curso de sucesivas infecciones naturales (37).

Ambas estrategias de vacunas frente a rotavirus han demostrado excelentes tasas de protección, particularmente frente a enfermedad grave que requiere hospitalización (69, 133) y han demostrado desarrollar inmunidad homotípica y heterotípica (78) La protección que generan ambas vacunas correlaciona la mayoría de las veces pero no siempre con los niveles de anticuerpos IgG o IgA específicos frente a rotavirus, pero no así con los niveles de anticuerpos neutralizantes específicos (134) Así, los anticuerpos neutralizantes específicos para la proteína VP7 (serotipo G) generados por la vacuna pentavalente RotaTeq™ son demasiado bajos para el elevado nivel de protección que generan. Además, individuos con deficiencia selectiva IgA se encuentran protegidos de la enfermedad grave a través de una respuesta compensatoria IgG específica que es mayor que la que se genera en individuos IgA competentes.

En el suero de individuos vacunados se encuentran anticuerpos IgA neutralizantes específicos de rotavirus que reconocen epítomos específicos de VP4 y VP7 y que han demostrado producir una amplia inmunidad heterotípica (118) Del mismo modo, se ha propuesto como posible correlato de protección de la vacunación niveles de células plasmáticas o células B específicas frente a rotavirus que portan receptores de migración intestinales (135).

Con relación a la inmunidad celular proporcionada por las vacunas de rotavirus hay muy poca información disponible. Se conoce que los individuos vacunados muestran células dendríticas circulantes capaces de estimular células T específicas frente a rotavirus y producir citocinas Th1 (9) Asimismo, niños

afectados con inmunodeficiencia severa combinada pueden desarrollar GEA tras la vacunación con rotavirus (136)

1.6 CORRELATOS DE PROTECCIÓN PARA LAS VACUNAS FRENTE A ROTAVIRUS

Aunque las vacunas actuales frente a rotavirus han demostrado ser altamente efectivas en la prevención de la enfermedad grave por diferentes tipos de rotavirus, el mecanismo de protección generado no está del todo claro (79) Tras la vacunación se ha observado en todo el mundo la generación de inmunidad homotípica y heterotípica, pero el nivel hasta el que esta protección heterotípica puede alcanzar comienza aun a ser explorado, especialmente en los países en vías de desarrollo (78) La vigilancia epidemiológica que se lleva a cabo en los países con programas de vacunación revelarán el grado en que esta protección heterotípica afecta a la diversidad de las cepas de rotavirus y si las variaciones en esta diversidad es atribuible a la fluctuación natural o representan especies nuevas de rotavirus que consiguen escapar a la presión de los programas de vacunación (137)

Hay una necesidad urgente en determinar los mecanismos y correlatos de protección de las respuestas inmunes específicas frente al rotavirus en humanos que puedan ser adquiridas a través de la infección natural o tras la vacunación. Sobre todo, porque se ha demostrado que la efectividad de las vacunas depende, al menos en parte del estatus socioeconómico de los países (138-140)

1.6.1 RV-sIgA como correlato de protección

Hasta la fecha se han propuesto varios mecanismos de protección generados tras la vacunación que se resumen en la **Figura 6**. En la gran mayoría de los ensayos clínicos realizados hasta la fecha se ha empleado la inducción de IgA séricas específicas de rotavirus (RV-sIgA) como marcador de respuesta vacunal (141-144) y a mayores se han reportado los títulos de anticuerpos neutralizantes serotipo-específicos en algunos ensayos clínicos (revisado en (81) De este modo, la respuesta a la vacuna se expresa en tasas de seroconversión o como el porcentaje de niños con aumento de título de anticuerpos en al menos tres veces sus niveles basales.

La revisión sistemática del valor de los anticuerpos RV-sIgA como correlato de eficacia de la vacuna demostró que tanto el nivel de protección como el mantenimiento de esta tras la vacunación era menor en aquellos individuos con menor tasa de seroconversión y que las tasas de mortalidad infantil en <5 años mostraba una correlación inversa con los títulos de IgA (138) En un estudio reciente se ha demostrado la correlación entre el nivel de anticuerpos unidos al fragmento secretor (tanto IgA como IgM) y el nivel de protección frente a la enfermedad, mostrando así un vínculo entre inmunidad mucosa y enfermedad (145)

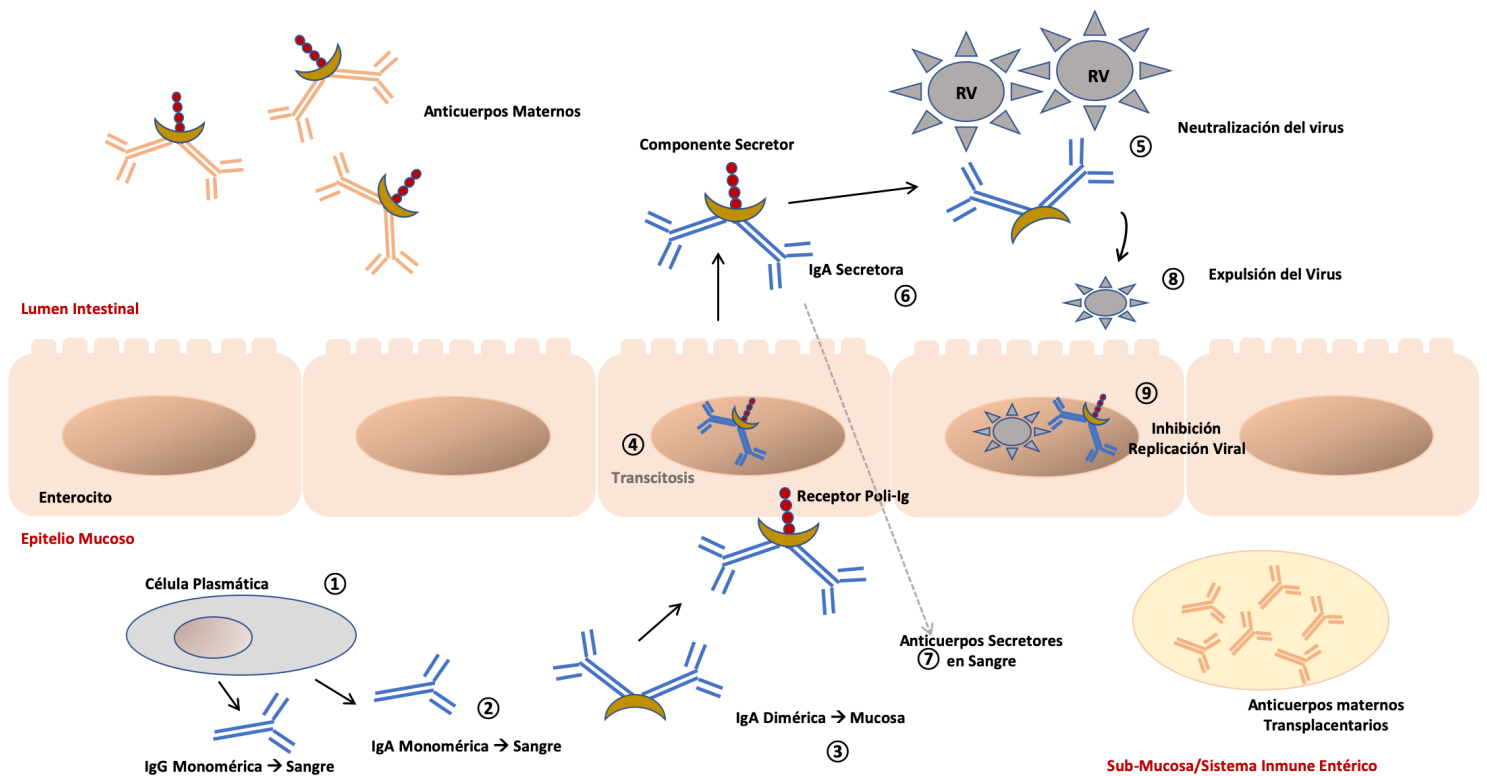


Figura 6: Mecanismos propuestos de inmunidad mediada por anticuerpos frente al rotavirus. (1) Células plasmáticas presentes en la mucosa intestinal incluyen poblaciones (2) secretoras de IgA e IgG monomérica que pueden ser detectadas en circulación en gran proporción (3) secretoras de IgA diméricas (unidas por la cadena J) que de igual modo pueden ser detectadas en sangre. (4) IgA dimérica (y también IgM pentamérica) interactúan con el receptor de poli-inmunoglobulina (pIgR) en la superficie basolateral del enterocito y por transcitos a la superficie apical (5) La IgA dimérica es liberada al lumen intestinal por proteólisis unida al componente secretor. Su función en el lumen intestinal es unirse al rotavirus y producir la exclusión de la mucosa intestinal y prevenir la infección. (6) Copro-IgA puede ser detectada en las heces y se correlaciona con los niveles en el duodeno proporcionando un marcador de inmunidad en el lugar de la infección (7) IgA secretora también puede ser detectada en suero a través de un mecanismo de retro-transcitos a través de la mucosa intestinal y puede representar un reflejo de la inmunidad intestinal (8) Durante la transcitos, anticuerpos frente a VP6 también pueden unirse al rotavirus una vez la proteína VP6 es expuesta durante la replicación viral, lo que resulta en expulsión viral (9) Anticuerpos frente a VP6 también inhiben la transcripción viral

Sin embargo, la medición de los títulos de RV-sIgA no proporciona ninguna información acerca de las proteínas de rotavirus diana de la protección heterotípica. Se han sugerido epítopos crossreactivos de VP4 y VP7 no neutralizantes o antígenos incluidos en la proteína VP6 como posibles candidatos (79) Anticuerpos específicos frente a VP6 se han demostrado a altos niveles tras la infección natural y la vacunación (146, 147) Está claro que anticuerpos frente a VP6 son los anticuerpos más comunes producidos por las

células B específicas frente a rotavirus, dada la gran inmunogenicidad de esta proteína (104, 148) Estos anticuerpos han demostrado en modelos animales capacidad de actuar intracelularmente, bloqueando el paso del virus a través de la mucosa y expulsando al virus de la mucosa intestinal (149) Además también han demostrado capacidad para inhibir la transcripción viral lo que explicaría también su efecto antiviral (150-152) Sin embargo estos anticuerpos han demostrado no ser protectores en cerdos a pesar de ser producidos localmente en la mucosa intestinal. Por tanto, está pendiente de determinar en humanos su papel funcional en la inmunidad heterotípica (153) De igual modo, anticuerpos frente a la enterotoxina viral NSP4 han mostrado conferir protección en modelos murinos pero no así en cerdos (154) Finalmente, anticuerpos que bloquean la interacción entre el virus y su receptor en la mucosa intestinal (HBGA, *histo-blood group antigens*) evitando el anclaje inicial han demostrado conferir protección frente a la infección por norovirus y por tanto debería ser explorado su papel como correlato de protección frente a la infección por rotavirus (155)

1.6.2 Nuevos correlatos de protección alternativos

Además de los parámetros serológicos, poco a poco se van conociendo más datos sobre el papel del sistema inmune innato y de las células T y B en la defensa frente al rotavirus.

Las tasas similares de protección de la vacuna monovalente y pentavalente en diferentes países con distinta circulación de cepas sugiere que la inmunidad frente al rotavirus es principalmente heterotípica (79) por tanto la especificidad de serotipo de la respuesta humoral es probablemente un aspecto menor en la búsqueda del correlato de protección. La búsqueda de otros correlatos de protección debería considerar marcadores heterotípicos que reflejen la respuesta inmune intestinal, ser capaces de persistir en el tiempo y cuya medida no se vea afectada por la presencia de anticuerpos de origen materno (134)

Actualmente se encuentran en consideración como correlatos de protección alternativos:

1.6.3 Anticuerpos secretores frente a rotavirus (RV-SIg)

Anticuerpos poliméricos (IgA o IgM) secretados al lumen intestinal que por transcitosis puedan alcanzar la circulación sanguínea (80) Estos anticuerpos pueden ser detectados en el suero por la presencia del componente secretor, esa parte del receptor polimérico de Ig que se une covalentemente al anticuerpo durante el proceso de secreción. Se han detectado RV-SIg una semana después de la infección aguda por rotavirus y correlacionan con los niveles presentes en el fluido intestinal (156) Hasta la fecha se han empleado solo en un ensayo

clínico de un precursor de la vacuna monovalente y mostraron cierto correlato de protección (145) Entre las limitaciones se encontraría el que gran parte de estos anticuerpos serían IgM y no está claro la persistencia en el tiempo.

1.6.4 Células B memoria y células plasmáticas específicas de rotavirus

Estudios animales y en humanos, han demostrado que células plasmáticas específicas de rotavirus circulantes pueden reflejar la respuesta inmune intestinal (80) Sin embargo, estas células pueden detectarse solo durante un pequeño periodo de 5-7 días antes de su migración a sus nichos en médula ósea. Por tanto, no está claro si pueden representar un buen reflejo de persistencia de inmunidad. Por otro lado, las células B memoria sí podrían detectarse en circulación y podrían de este modo reflejar la inmunidad mucosa más fielmente (157) y así se demostró en determinados ensayos clínicos (158) Se necesitan más estudios para un mejor entendimiento y evolucionar métodos de medición de este tipo celular.

1.6.5 Células T específicas frente a rotavirus

Modelos animales han demostrado que gran parte de los RV-IgA son dependientes de células T CD4+ (159) Mas aun, el desarrollo de anticuerpos neutralizantes tras la vacunación es dependiente de la edad de los individuos(160) lo que refleja la dependencia del numero de células T específicas del virus (161) De igual modo que las células B memoria, en adultos sanos las células T específicas frente a rotavirus expresan marcadores de migración intestinal (128) El desarrollo de la tecnología de tetrámeros clase II con epítomos

específicos de rotavirus ha permitido la detección de células T CD4+ circulantes que expresan receptores de migración intestinales en adultos sanos y en niños vacunados (162) por lo que es necesario explorar su utilidad como correlato de protección.



1.7 ORGANIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA MUCOSA INTESTINAL

La mucosa del intestino proporciona la interfaz para la interacción entre el huésped humano y el ambiente externo. Junto con los demás lugares de la mucosa del organismo constituyen el órgano más grande del cuerpo, cubriendo una superficie de más de 400 m² y encargados de mantener una homeostasis inmunológica a través de la inmunidad innata y adquirida (163) Constituye por tanto la ruta de entrada para el rotavirus y un gran número de patógenos que se van a encontrar en primer lugar con una serie de barreras físicas y químicas entre las que se incluyen mucinas y defensinas secretadas por las células epiteliales intestinales (164) Además, la mucosa intestinal está densamente poblada de células inmunes pertenecientes al sistema innato y adaptativo, y sus superficies son la localización del sistema inmune secretor, cuya mayor inmunoglobulina es la IgA secretora (165)

Poco a poco se avanza en el conocimiento del funcionamiento de este intrincado sistema inmune y su interacción con el sistema inmune central o sistémico. En los últimos años se han desarrollado, además, vacunas como la del rotavirus, administradas por vía oral con el objetivo de iniciar la reacción inmune en los sitios mucosos para proporcionar protección tanto a nivel de la mucosa como a nivel sistémico. En contraste, las vacunas inyectadas convencionales administradas en los tejidos o en la circulación, habitualmente no logran una protección de la mucosa efectiva (166)

1.7.1 El sistema inmune de la mucosa (MALT)

El sistema inmune de la mucosa se encuentra funcionalmente y anatómicamente organizado en dos componentes principales: los tejidos linfoides asociados a mucosa (*MALT, mucosa-associated lymphoid tissues*), donde se inician las respuestas inmunitarias y conforman los **lugares inductores**, y la región difusa de la lámina propia y tejido glandular, que conforman los **lugares efectores** para la producción de anticuerpos y respuestas inmunes mediadas por células (163) (**Figura 7**) Hay una constante migración de células inmunes que han reconocido el antígeno desde los lugares inductores a los lugares efectores, lo que constituye la base del funcionamiento común del sistema inmune de la mucosa.

Los MALT comparten muchas características comunes a los órganos linfoides secundarios del tejido sistémico. La entrada del antígeno a este sistema se realiza a través de células especializadas membranosas (células M) que se localizan entre la capa epitelial del tejido mucoso (167) Este tejido también contiene todas las demás células inmunes como son las células dendríticas, macrófagos, células T y células B, requeridas para la generación de una respuesta inmune específica frente al antígeno. Una vez se genera la respuesta, principalmente células T CD4+ y células B IgA+ específicas frente al rotavirus migran desde el lugar de inducción, principalmente **placas de Peyer** en el sistema intestinal, hacia los ganglios linfáticos regionales a través de los vasos linfáticos eferentes y hacia los sitios efectores como las regiones de lámina propia de las diferentes mucosas del organismo (168) Para dirigir esta migración, las células inmunes expresan integrinas en su membrana del tipo $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 lo que resulta en un tráfico selectivo hacia los sitios efectores de la mucosa (169)

Una vez en los lugares efectores de la mucosa, las células B IgA+ se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos secretores por acción de las citocinas Th2 (IL-5 e IL-6) LA existencia de un receptor polimérico de Ig (pIgR) en la membrana basolateral de las células epiteliales en estas regiones permite la secreción de la IgA dimérica secretora al lumen exterior de la mucosa (170) **(Figura 7)**

1.7.2 Los diferentes sistemas MALT y la comunicación entre ellos

Según el tipo de mucosa en el organismo se diferencian siete tipos de sistemas MALT (171)

- **BALT** (bronchus-associated lymphoid tissue) asociado a los bronquios, se encuentra en la mucosa que recubre las vías respiratorias
- **GALT** (gut-associated lymphoid tissue) asociado al tubo digestivo, se encuentra en toda la mucosa a lo largo del sistema gastrointestinal
- **NALT** (nose-associated lymphoid tissue) asociado a la nariz
- **CALT** (conjunctiva-associated lymphoid tissue) asociado a la conjuntiva
- **LALT** (larynx-associated lymphoid tissue) asociado a la laringe
- **SALT** (skin-associated lymphoid tissue) asociado a la piel
- **VALT** (vulvo-vaginal-associated lymphoid tissue) asociado al sistema genital

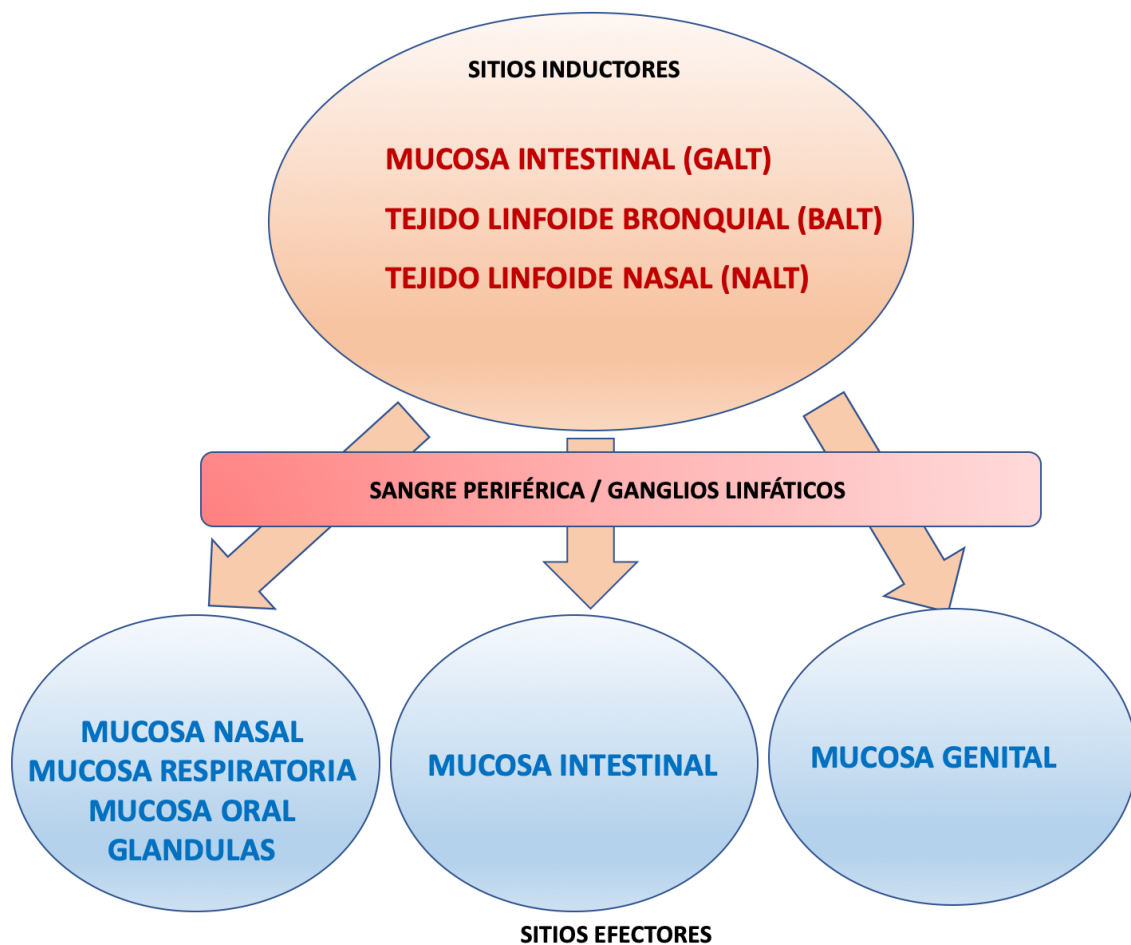


Figura 7: Esquema de funcionamiento de la respuesta inmune en el sistema inmune mucoso con los sitios inductores y efectores. Los antígenos administrados a través de los **sitios inductores** (Mucosa intestinal, Tejido Linfoide Bronquial y Tejido Linfoide Nasal) activan las células inmunitarias en los ganglios linfáticos regionales (p. ej. Placas de Peyer en mucosa intestinal) donde se generan células inmunes efectoras que viajan a través de la sangre periférica y la red linfática ganglionar hacia el resto de las mucosas del organismo, que actúan como **sitios efectores**, proporcionando la defensa global frente al antígeno.
GALT: Gut-associated lymphoid tissue; BALT: Bronchial-associated lymphoid tissue; NALT: Nasal-associated lymphoid tissue

De todos ellos los sistemas más complejos y mejor organizados son los tres primeros BALT, GALT y NALT que actúan a su vez de principales sitios inductores (172-174) Destaca el sistema de la mucosa asociado al sistema gastrointestinal (GALT) por su organización y complejidad y por constar de tejido linfoide organizado similar a un ganglio linfático y denominado **Placas de Peyer**,

que actúan como sitios inductores principales (172) Desde estos sitios inductores donde se inicia la respuesta inmunitaria se transportaran las células efectoras (células B-IgA, células T CD4+) hacia los sitios efectores del resto de los tejidos mucosos. Podemos hablar por tanto de un sistema perfectamente organizado de tráfico celular entre los lugares donde se inicia la respuesta inmune (sitios inductores) hacia los lugares donde se produce la respuesta efectora (sitios efectores) (174) **(Figura 8)**



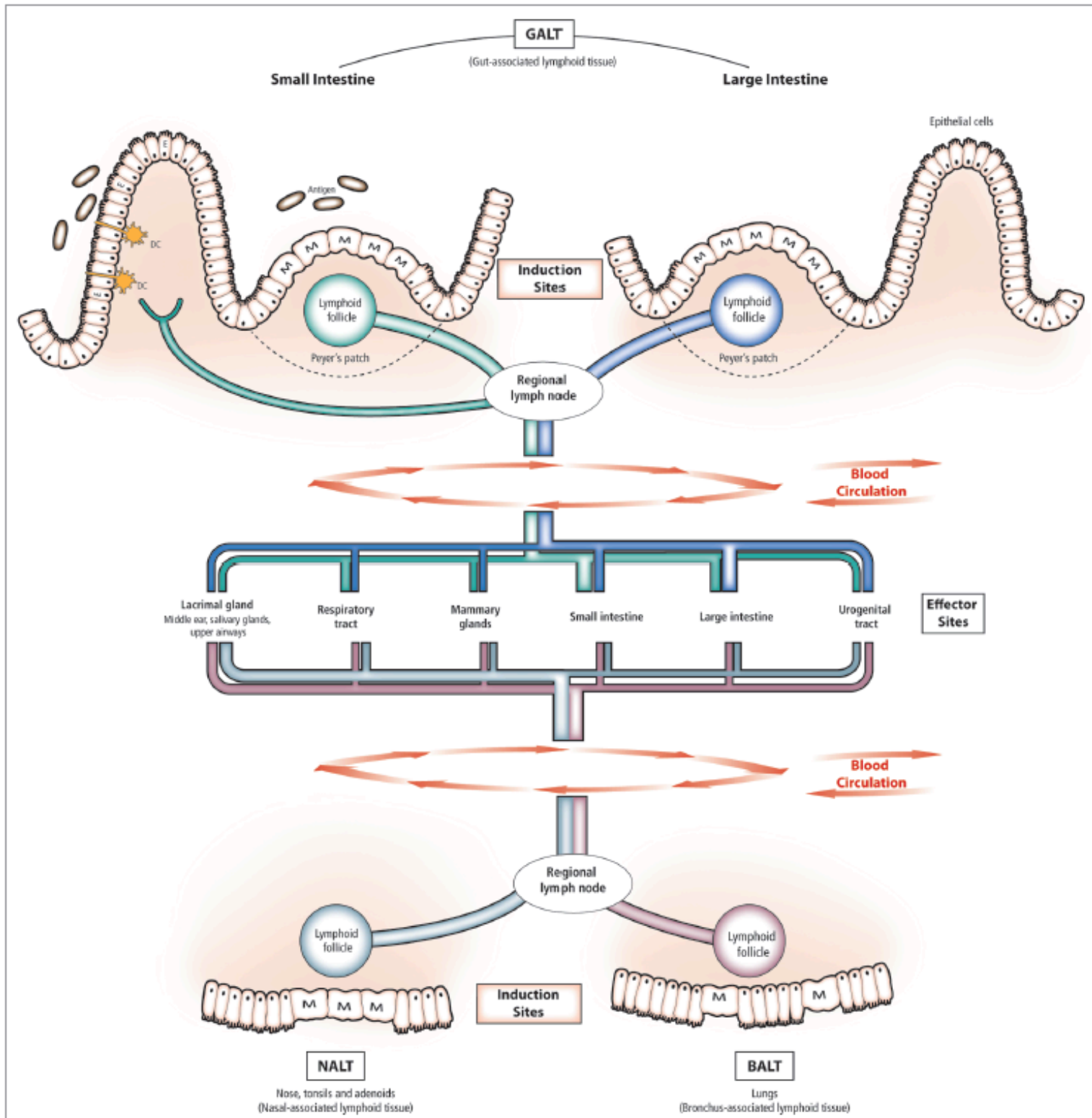


Figura 8: Diagrama esquemático del funcionamiento del sistema inmune de la mucosa organizado en sitios inductores y efectores. Se muestra el tráfico celular a partir de los sitios de inductores principales GALT, NALT y BALT hacia los sitios efectores que comprenden los demás sistemas de la mucosa. *Adaptado a partir de Otczyk C & Cripps AW Human Vaccines 2010 6(12)*

1.8 ROTAVIRUS COMO ENFERMEDAD SISTÉMICA: “ROTAVOLUTION”

Durante muchos años la patología del rotavirus se consideraba una enfermedad limitada solo al tracto gastrointestinal y carente de interés para la gran mayoría de la comunidad científica. Sin embargo, evidencias recientes sobre las implicaciones sistémicas de la infección por rotavirus han hecho reconsiderar el interés por esta patología (175).

Actualmente está claro que rotavirus va más allá de una simple infección gastrointestinal. El término clásico de gastroenteritis aguda (GEA) por rotavirus está siendo reemplazado por el den “enfermedad por rotavirus” lo que refleja las implicaciones sistémicas de la infección (176). Estamos, por tanto, antes una auténtica revolución (“*rotavolution*”) de la percepción clínica tradicional de la infección por rotavirus, ayudado por el recientemente demostrado impacto de las vacunas más allá de la patología gastrointestinal (177) y el hecho de que la diarrea no es necesaria para el diagnóstico de la infección por rotavirus dado que un importante porcentaje de pacientes con rotaviremia no presentan clínica intestinal (178).

El espectro clínico de la infección por rotavirus es actualizado cada año, con una creciente evidencia que apunta hacia una conexión entre la infección por rotavirus y el desarrollo de ciertas enfermedades autoinmunitarias en individuos genéticamente predispuestos (177) Esta recopilación de manifestaciones extra intestinales nos lleva a proponer un modelo “iceberg” para la enfermedad por rotavirus, donde la parte visible serían las manifestaciones clínicas típicamente

asociadas con la patología intestinal (vómitos, diarrea y deshidratación) mientras que la parte oculta comprendería todas las manifestaciones extra intestinales relacionadas como las convulsiones o el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias, pasando por la infección asintomática sin presencia de diarrea (177) (Figura 9)

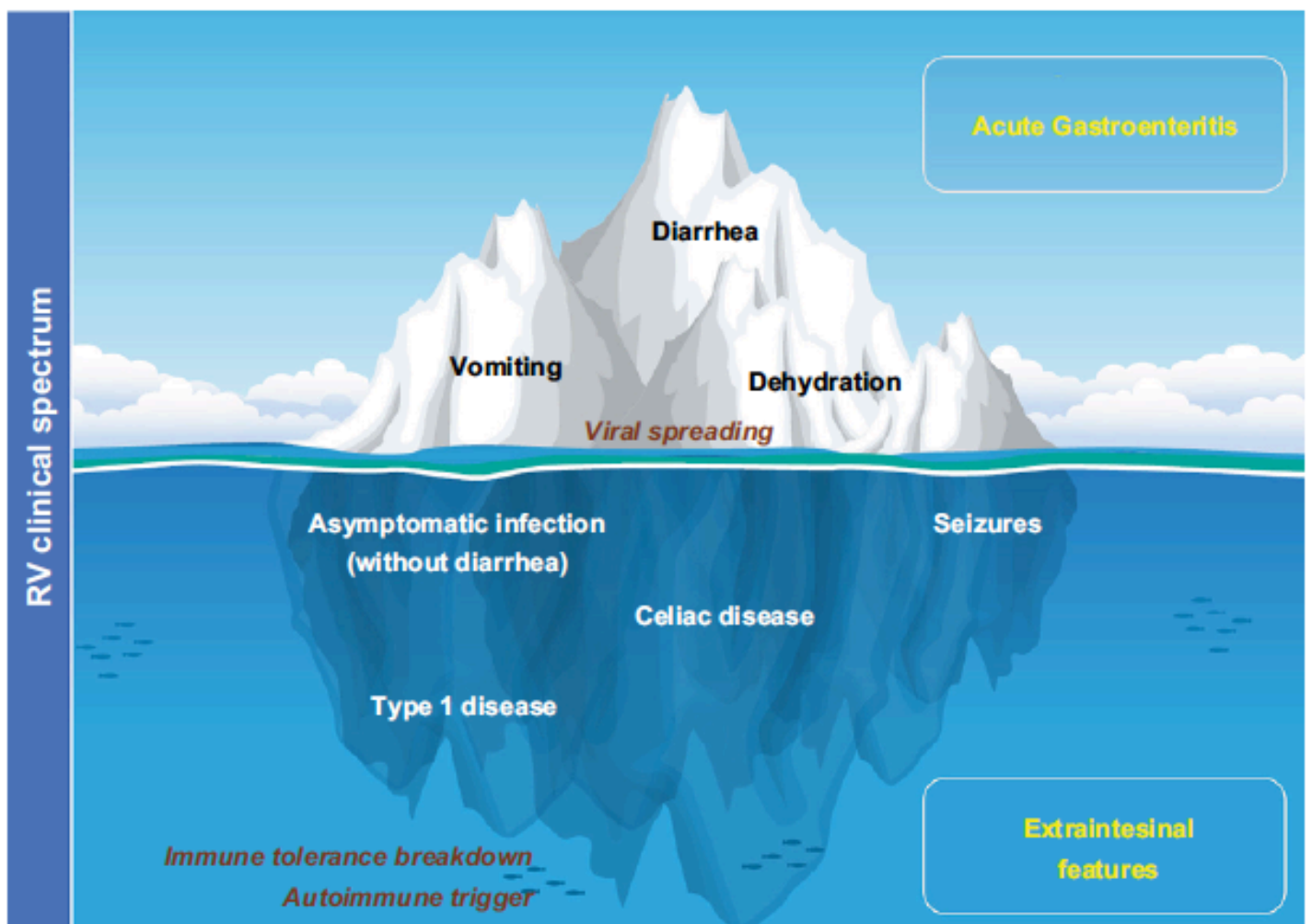


Figura 9: Modelo de iceberg para la infección por rotavirus. Diarrea, vómitos y deshidratación son solo la parte más visible y reconocible de la enfermedad por rotavirus, pero en la gran mayoría de las veces se produce una diseminación viral que puede desencadenar en una serie de manifestaciones extra intestinales ocultas como son las convulsiones o el desarrollo de patología autoinmunitaria en individuos genéticamente susceptibles. **Imagen obtenida de Gómez-Rial J et al Infect and Drug Resist 2019**

La implementación de las vacunas frente a rotavirus durante la última década ha producido además de un descenso significativo de la patología intestinal moderada o grave (179), también ha impactado sobre las manifestaciones extra intestinales asociadas a rotavirus en una forma que estamos empezando aún a comprender. Tras el trabajo inicial de Payne demostrando una reducción de las hospitalizaciones por convulsiones tras la incorporación de la vacunación frente al rotavirus en USA (180) continuaron otros grupos mostrando resultados en la misma línea (181-186).

No solo se ha demostrado impacto de las vacunas sobre el desarrollo de convulsiones; en los últimos años diversos estudios han encontrado un efecto protector de la vacuna en el desarrollo de patología autoinmunitaria como la enfermedad celíaca (187, 188) y diabetes mellitus tipo 1 (189, 190) demostrando unos efectos bien heterólogos o bien directos hasta ahora desconocidos y que darán mucho que hablar durante los próximos años.

2 JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

Actualmente, los mecanismos de protección frente al rotavirus bien sean de forma natural o a través de la vacunación, son solo parcialmente conocidos y no se encuentran claramente definidos. Sabemos que la exposición repetida al virus, ya sea de forma natural o a través de dosis sucesivas de vacuna, genera protección. Sin embargo, los mecanismos implicados son prácticamente desconocidos, o extrapolados de otras patologías, y no se dispone de biomarcadores específicos contrastados, ni de protección clínica, ni de inmunidad natural o inducida por vacunación, que sean reproducibles y útiles.

No existe actualmente una correlación entre el nivel de protección y los títulos de anticuerpos neutralizantes serotipo-específicos generados tras la vacunación. La tasa de seroconversión, sobre todo en países en vías de desarrollo, no se corresponde con el nivel de protección, por lo que es necesario la búsqueda de correlatos de protección alternativos a los actuales. En esta búsqueda se debería considerar el compartimento de la mucosa y el componente celular de la respuesta inmunitaria, pobremente estudiado en la protección frente al virus.

Por otro lado, hoy sabemos que nuestra respuesta inmune es el resultado de la activación coordinada de cientos-miles de genes que pueden ser detectados con gran precisión y de modo indiferente en el genoma mediante perfiles de expresión de ARN mensajero mediante análisis transcriptómicos. Se reconoce

que los genes que están regulados de forma diferencial en estas respuestas específicas funcionan dentro de redes altamente reproducibles que pueden ser detectadas dentro de un conjunto de datos de expresión mediante el uso de algoritmos apropiados. Mediante esta estrategia se permite entender mejor la interacción entre los antígenos, tanto naturales como vacunales, y nuestro sistema inmunitario, y permite identificar nuevos biomarcadores diferenciales de respuesta inmune o protección clínica que permitan guiar el desarrollo de nuevas vacunas frente a rotavirus.

El reconocimiento de los mecanismos de acción concretos del sistema inmunitario frente a la infección y la vacunación nos permitirá aumentar la capacidad de hacer mejores vacunas racionales en el espectro de vacunas actuales y futuras, no solo en fases preclínicas y clínicas, sino durante su implementación poblacional, permitiendo incluso plantearse la vacunación individualizada en función de los marcadores de protección natural o vacunal identificados, con los consiguientes ahorros tanto en el proceso de desarrollo vacunal como en su aplicación poblacional a gran escala.

Por ello, la finalidad del presente trabajo de tesis es **profundizar desde una perspectiva “-ómica” en el estudio de la infección natural y la vacunación por rotavirus**. Para ello hemos realizaremos un abordaje transversal de evaluación de la respuesta inmune desencadenada mediante la infección natural o mediante la vacunación frente al rotavirus, basado en la **inmunogenómica** y la **vacunómica**.

3 OBJETIVOS

El presente trabajo de tesis persigue los siguientes objetivos:

- 1. Caracterizar la respuesta inmune natural y artificial frente al rotavirus**
- 2. Búsqueda de correlatos de protección en las vacunas frente a rotavirus**
- 3. Caracterización de la huella transcriptómica de la enfermedad natural y de la vacunación frente a rotavirus**
- 4. Identificación de biomarcadores predictivos de gravedad en la infección por rotavirus**

4 MATERIAL Y MÉTODOS

En el desarrollo del presente trabajo de investigación se han empleado los siguientes materiales y métodos:

4.1 Sujetos del estudio

Para la realización de este trabajo de investigación se reclutaron un total de **148** sujetos de los cuales **27** pertenecían a la cohorte de paciente infectado y **121** pertenecían a la cohorte de paciente vacunado. Los diferentes experimentos se han realizado sobre el total o subgrupos de pacientes pertenecientes a ambas cohortes. Dependiendo del experimento llevado a cabo, se utilizaron distintas muestras biológicas de los pacientes y en tiempos de muestreo diferentes (ver detalles en el siguiente apartado). El reclutamiento tuvo lugar durante el período 2013-2015.

4.1.1 Criterios de inclusión y exclusión en el estudio

Se aplicaron diferentes criterios de inclusión/exclusión en función de la cohorte:

a) Sujetos cohorte vacunados

Los sujetos de esta cohorte fueron reclutados en la unidad de ensayos clínicos del Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. Se consideró elegible para el presente estudio cualquier niño sano que acudía para recibir la vacuna pentavalente del rotavirus siguiendo las indicaciones de la ficha técnica de la vacuna. Durante el período de duración del estudio solo la vacuna pentavalente frente a rotavirus (Rotateq®) estaba autorizada por las autoridades sanitarias.

El presente estudio ha sido un estudio observacional sin intervención alguna en el procedimiento de vacunación o calendario vacunal por parte del equipo investigador. Estos sujetos fueron reclutados de entre aquellos que habían decidido vacunar a sus hijos frente al rotavirus tras consejo de su pediatra.

b) Sujetos cohorte infectados

Los sujetos de esta cohorte fueron reclutados en el servicio de urgencias pediátricas o en el área de hospitalización de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, con diagnóstico confirmado de gastroenteritis por rotavirus.

Se consideró elegible para el estudio cualquier paciente de hasta 5 años de edad con un episodio confirmado de gastroenteritis aguda por rotavirus, siempre y cuando cumplierse las siguientes condiciones: a) 3 o más deposiciones menos consistentes de lo habitual en un periodo de 24 horas, asociadas a vómitos o no; b) síntomas ocurridos en los 7 días previos al reclutamiento, precedidos de un periodo de al menos 14 días libres de síntomas; c) el episodio de gastroenteritis aguda no debía haber ocurrida en las dos semanas previas al inicio de los síntomas actuales. Para estos pacientes se recogieron datos clínicos y epidemiológicos, incluyendo fecha de vacunación y número de dosis recibidas. El diagnóstico de rotavirus se consideró válido si la detección había sido mediante cultivo y/o inmunoensayo.

Criterios de no-inclusión/exclusión

La participación en este estudio era incompatible con la participación del sujeto en otro estudio observacional o de intervención al mismo tiempo si este incluye cualquier producto de investigación que pueda interferir en la respuesta inmune del paciente (derivados sanguíneos, medicación inmunosupresora, etc.)

Aspectos regulatorios

El presente estudio de investigación ha sido realizado de acuerdo con el código de Buenas Prácticas Clínicas. Previo a la inclusión de pacientes en el estudio se obtuvo el consentimiento informado de los padres o tutor legal de cada individuo. El proyecto de investigación fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEIC ref 2012/301, ver anexo)

4.2 Muestras recogidas para el estudio

Para la realización del estudio se obtuvieron de cada paciente **tres muestras de sangre con 3,5 ml de volumen cada una** (una muestra para estudios de transcriptómica, una muestra para ensayos de estimulación celular WBS y una muestra para obtención de suero para lo cual fue centrifugada durante 15 min a 1000 g y almacenado el suero alicuotado a -30°C) y **una muestra de saliva** sin estimular obtenida mediante hisopo Whatman localizado bajo la lengua durante 5 minutos. Los hisopos fueron eluidos en 0.4 ml de tampón fosfato salino (PBS) y

centrifugados a 800 g durante 10 minutos para eliminar células epiteliales y mucina. Los sobrenadantes se almacenaron a -30°C previo a su análisis. Todas las muestras se recogieron en dos puntos independientes del estudio:

- a) *Cohorte Paciente Infectado*: en **Fase Aguda** durante el reclutamiento y durante el **período de Convalecencia** al menos 3 meses tras la completa recuperación clínica
- b) *Cohorte Paciente Vacunado*: al reclutamiento (**pre-dosis 1**) y aproximadamente 40 días tras haber recibido la tercera dosis de vacuna pentavalente (**post-dosis 3**)

4.3 Vacuna empleada durante el estudio

Los pacientes pertenecientes a la cohorte vacunados recibieron siguiendo la recomendación de su pediatra la vacuna pentavalente frente al rotavirus RotaTeq® fabricada por Merck Sharp and Dohme (Waarderweg, NL) y distribuida en nuestro país por MSD España.

4.4 Antígenos de rotavirus empleados ensayo estimulación in vitro

El antígeno de rotavirus salvaje empleado perteneciente a la cepa Wa-1 y cultivado en células MA-104 fue cedido por el Prof Dr Timo Vesikari del Centro de Investigación en Vacunas de la Universidad de Tampere (Finlandia)

El antígeno de rotavirus vacunal empleado se obtuvo a partir de la vacuna monovalente frente a rotavirus (Rotarix™) consistente en una cepa de rotavirus humano atenuado RIX4414.

4.5 Procedimientos realizados durante el estudio

4.5.1 Extracción de ARN y preparación de la muestra

Se recogió 1 ml de sangre completa en tubo PAXgene® Blood RNA (Pre-AnalytiX GmbH) mediante procedimiento estándar de flebotomía, y siguiendo instrucciones del fabricante, se mezcló mediante inversión del tubo 10 veces y se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas, tras lo cual se congeló a -20°C toda la noche y posteriormente a -80°C para el almacenamiento hasta su uso. Previo a la extracción de ARN, las muestras congeladas se mantuvieron durante 3 horas a temperatura ambiente. La extracción del ARN de la muestra se realizó mediante el kit de extracción de ARN PAXgene® Blood siguiendo las indicaciones del fabricante. La calidad/cantidad del ARN extraído se determinó empleando el sistema Bioanalyzer 2100.

4.5.2 Análisis transcriptómico mediante ARN-Seq

4.5.2.1 Eliminación del ARN de las globinas

Los leucocitos representan <1% de las células de la sangre completa. El 99% de la fracción celular de la sangre completa comprende a los glóbulos rojos, donde se incluyen reticulocitos inmaduros que contienen grandes cantidades de ARNm de globinas. Este ARNm de globinas puede llegar a representar el 70% del ARNm total en la sangre completa y puede comprometer la detección de otros ARNm

específicos de leucocitos. Por ello se procedió a disminuir la cantidad de ARN de las globinas (>95%) empleando el kit para reducción de globinas en sangre GLOBINclear® (Life Technologies; CA, USA).

4.5.2.2 Preparación de las librerías y secuenciación del ARN

Las fracciones de ARNm Poli(A)+ fueron aisladas a partir del ARN total y se obtuvieron las librerías de ADNc siguiendo las recomendaciones de Illumina. El ARN poli(A)+ fue aislado mediante bolas magnéticas unidas a oligos de poli(T) y fragmentadas químicamente previamente a la transcripción reversa y a la generación del ADNc. Los fragmentos de ADNc obtenidos fueron reparados, se añadió una base sencilla A al extremo terminal 3' y se ligaron los adaptadores. Finalmente, los productos fueron purificados y enriquecidos mediante PCR para crear la librería de ADNc de doble cadena final indexada. LA calidad de las librerías fue determinada empleando el ensayo de alta sensibilidad del equipo Bioanalyzer 2100. La cuantificación de las librerías fue determinada mediante PCR en tiempo real en el LightCycler 480 (Roche)

Previo a la generación de los clusters en el sistema cbot (Illumina), se generó un pool equimolar de las librerías obtenidas. Este pool fue secuenciado mediante secuenciación en pares (100 x 2) en un secuenciador Illumina HiSeq 2000.

4.5.2.3 Análisis computacional

Las lecturas de secuenciación en pares del transcriptoma global fueron mapeadas frente a la versión del genoma humano proporcionada por Ensembl (versión GRCh37/hg19) empleando el algoritmo *tophat2* (191). Los registros alineados fueron reportados en formato BAM/SAM (192). Las lecturas (reads) de calidad insuficiente (score Phred < 10) fueron eliminadas empleando el software Picard Tools versión 1.129 (<http://picard.sourceforge.net/>). La identificación de los genes se hizo empleando la base de datos Ensembl (lanzamiento 75) y el método *cufflinks* de ensamblaje de novo (v 2.2.1) (193). El análisis de expresión diferencial entre condiciones fenotípicas se realizó empleando la herramienta de inferencia Bayesiana *cuffdiff*. Se seleccionaron los genes diferencialmente expresados con un valor de incremento (Δ) de al menos 2 y un valor *P*-ajustado <0.05.

El análisis de enriquecimiento funcional se realizó empleando el test hiper-geométrico propuesto en *ToppFun* (194). Para determinar si una categoría determinada estaba sobre-representada se empleó el valor de *P*-ajustado de 0.05 como umbral de significación estadística.

El valor FPKM (*fragments per kilobase of exón per million fragments mapped*) se empleó para la normalización de los datos (195) en relación a la longitud de los genes, el tamaño de la librería por muestra, contenido GC, entre otros. El valor FPKM indica el número de lecturas de un determinado gen por kilobase de exón (dependiente

de la longitud del gen) y por millón de lecturas (dependiente del tamaño de la librería).

La información de los genes representada por los perfiles transcriptómicos obtenidos en el presente estudio ha sido obtenido empleando *Gene Ontology* (GO) (196, 197). El análisis de enriquecimiento fue llevado a cabo empleando la Enciclopedia Kyoto de genes y genomas (KEGG) (198). Los patrones de expresión fueron codificados empleado un método de clasificación de genes basado en distribución hipergeométrica (199)

4.5.2.4 *Análisis de componentes principales*

Se hizo un análisis de componentes principales (PCA) s para mejorar la visualización de los patrones de transcriptoma global de los datos de ARN-seq en casos y controles. El PCA permite la inspección de patrones diferenciales de expresión entre muestras e identificación de posibles *outliers*, así como facilitar las decisiones con relación al análisis basado en clusters de muestras. El PCA se realizó empleando la librería *adeget* (200) del software estadístico R (<http://www.r-project.org>)

4.5.2.5 *Inferencia de redes*

La inferencia de redes reguladoras empleándose hizo empleando el software GeneMANIA (v 3.2.1; <http://www.genemania.org>) Este software usa un gran conjunto de datos funcionales de interacciones

para encontrar genes que están relacionados con un conjunto de genes de entrada (201)

4.5.3 Determinación de RV-IgA en muestras de suero y saliva mediante ELISA directo

El método para determinación de anticuerpos anti-IgA específicos frente a rotavirus empleado se adaptó del previamente descrito por Friedman (202). El antígeno salvaje de rotavirus (10^6 PFU) se capturó en placas de poliestireno afinidad intermedia Greiner Bio-one Microlone (Fisher Scientific) incubando toda la noche a 4°C en tampón de captura NaHCO_3 pH 9,5. Tras lavado de exceso de antígeno de rotavirus con tampón de lavado fosfato salino-albumina sérica bovina (PBS-BSA) 1% se bloquean los pocillos con PBS-BSA 5% durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras de suero y saliva se incuban en los pocillos a una dilución 1:25 y 1:10 respectivamente en PBS-Tween₂₀ 0.1%-BSA 1% durante 24 horas a 4°C . Tras los lavados, se incuban los pocillos durante 1 hora con anticuerpo monoclonal específicos frente a IgA Goat Anti-Human IgA-HRP (abcam ab97215, Cambridge, UK) diluido 1/100 en PBS-Tween₂₀ 0.1%-BSA 1% seguido de revelado con solución 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma-Aldrich CL07) y deteniendo la reacción a los 30 minutos con solución Stop (Sigma-Aldrich S5814) La lectura en el espectrofotómetro se realizó a una longitud de onda de 450nm

4.5.4 Determinación por multiplexado de citocinas en suero y saliva mediante xMAP-Luminex®

El ensayo para detección de citocinas se realizó mediante el kit Human Map Miliplex HCYTOMAG-60K (Merck Millipore, Billerica, MA). El panel de citocinas estaba constituido por Interferon-alpha2 (IFN- α_2), interleucina-8 (IL-8), interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-10 (IL-10), interleucina-15 (IL-15), interleucina-12 subunidad p70 (IL-12_{p70}), factor de necrosis tumoral-alpha (TNF- α), interferón-gamma (IFN- γ) e interleucina-6 (IL-6) Los ensayos se llevaron a cabo en la plataforma Luminex® 200.

Tras reconstituir las microesferas siguiendo las indicaciones del kit se prepara el coctel de microesferas, así como los estándar y controles correspondientes. Se incuban 25 μ l de suero o saliva (netos, sin diluir) junto con 25 μ l de solución tampón y 25 μ l del coctel de microesferas. Se incuba durante toda la noche a 4°C y tras los consiguientes lavados se añaden 25 μ l de Anticuerpo de detección incluido en el kit y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 25 μ l de solución de Ficoeritrina-Estreptavidina y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras el lavado final se añaden 150 μ l de líquido de sistema Labscan y se realiza la lectura en el equipo Luminex®200.

Para el análisis de los datos obtenidos se emplea el software de análisis xPONENT® del equipo que transforma los valores de intensidad media de fluorescencia (MFI) en unidades de concentración empleando el

análisis de regresión logística de 5 parámetros que recomienda el fabricante. Finalmente se aplica el factor de dilución empleado para el cálculo del valor final.

Para la detección del interferón-lambda (IFN- λ) y la interleucina-22 (IL-22) se empleó un kit ELISA Duoset (R&D Systems, Minneapolis, MN) consistente en anticuerpos de captura y detección específicos, así como las proteínas estándar recombinantes correspondientes. En primer lugar, se transfieren 100 μ l del correspondiente anticuerpo de captura a una placa de ELISA Greiner Bio-one Microlone (Fisher Scientific) de afinidad intermedia. Se incuba toda la noche a temperatura ambiente y al día siguiente se aspiran los pocillos y se lava tres veces con el tampón de lavado que incluye el kit. Tras este proceso, se bloquea la placa con 300 μ l de tampón de bloqueo incluido en el kit durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas ya están listas para ser incubadas con las muestras de suero y saliva (netos, sin diluir) y los correspondientes estándar durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se incuban con 100 μ l del anticuerpo biotinilado de detección durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se añaden 100 μ l de Streptavidina-Peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente evitando la luz directa sobre la placa. Tras el tiempo de incubación se lava la placa y se añaden 100 μ l de la solución sustrato incluida en el kit durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene añadiendo 50 μ l de solución *Stop* a cada pocillo y se agita la placa para una correcta homogenización de la solución. La lectura de la absorbancia se realiza en

un espectrofotómetro a 450 nm, con corrección a 540 nm para eliminar interferencias. Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos son extrapolados mediante análisis logístico de 4 parámetros a partir de la curva de concentración estándar realizada para obtener, tras aplicar el factor de corrección empleado, el valor final de concentración de cada muestra.

4.5.5 Evaluación de la respuesta inmune celular mediante ensayo de estimulación en sangre completa (WBS, whole blood stimulation assay)

El método empleado es adaptado del protocolo descrito por Thurm & Halsey (203) descrito a continuación: 1 ml de sangre completa heparinizada se diluyó 1:5 en RPMI1640 (Gibco, Grand Island, NY) y se distribuyó en cuatro tubos polipropileno de 15 ml (Fisher Scientific, Grand Island, NY) y fueron estimulados durante 24 horas (a 37°C en atmosfera 5% CO₂) con 10µg/ml de Fitohemaglutinina (PHA, a partir de *Phaseolus vulgaris*, Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 5µl solución rotavirus salvaje (10x10⁶ PFU/ml de cepa Wa-1 cultivada en células MA104) y 5µl solución rotavirus vacunal (RotaTeq®, conteniendo reasortantes de rotavirus humano-bovinos producidos en células Vero, ~10x10⁶ PFU) y 5µl RPMI como control de estimulación basal. La sangre fue estimulada siempre dentro de las 4 horas tras la extracción. Tras el período de incubación las muestras fueron centrifugadas a 2000g durante 10 minutos y los sobrenadantes almacenados a -80°C. La fracción celular restante se

sometió a criopreservación para posteriores estudios de citometría de flujo.

Posteriormente, los sobrenadantes fueron analizados para determinación múltiple de citocinas mediante procedimiento descrito en el punto 5.4 con el kit Human Map Miliplex HCYTOMAG-60K (Merck Millipore, Billerica, MA) a una dilución de la muestra 1:10 en plataforma Luminex®200.

4.5.6 Criopreservación de sangre completa

La fracción celular resultante tras los ensayos de estimulación en sangre completa se sometió a criopreservación para posteriores estudios de citometría de flujo mediante método descrito por Paredes et al (204) La fracción celular (500 μ l) se transfiere lentamente a crioviales de 1,8 ml conteniendo 500 μ l de medio de congelación (90% Suero Ternera Fetal + 10% DMSO (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) en frío. La solución resultante se mezcla mediante inversión y se colocan en recipiente Corning de congelación CoolCell (Fisher Scientific, Grand Island, NY) a -80°C

Previo a los estudios de citometría de flujo, los crioviales serán descongelados por inmersión en baño maría a 37°C hasta su completa descongelación.

4.5.7 Análisis de expresión de marcadores de activación en superficie celular mediante citometría de flujo

La sangre completa descongelada se reparte (100µl) en tubos de poliestireno 12x75mm y se incuba con los siguientes Anticuerpos Monoclonales de Becton Dickinson (Bergen, JE): CD45 PerCP-Cy5.5 (clon 2D1), CD69 FITC (clon L78), CD3 APC (clon SK7), CD4 PE (clon SK3), CD8 PE (clon SK1), CD16 PE (clon B73.1), CD56 APC (clon NCAM16) empleando las siguientes combinaciones: CD69-FITC+CD4-PE+CD3-APC+CD45-PerCP (células T CD4+); CD69-FITC+CD8-PE+CD3-APC+CD45-PerCP (células T CD8+); CD69-FITC+CD16-PE+CD56-APC+CD45-PerCP (células Natural Killer). Se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Tras la incubación se añaden 2 ml de Solución de Lisis 1x (Becton Dickinson, Bergen JE) y se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos. Al finalizar el periodo de incubación se centrifugan los tubos a 350g durante 5 minutos y se descarta el sobrenadante. Se realiza un lavado con 3 ml de PBS, y se vuelve a centrifugar a 350g durante 5 minutos. Tras el lavado se resuspende el pellet celular en 500 µl de PBS y se analizaron en citómetro de flujo BD FACSCalibur empleando el programa CellQuest para adquisición y análisis de fluorescencia. Se analizó sobre la población de células que expresaban el marcador CD45, la proporción de células T-CD4+, células T-CD8+ y células Natural Killer CD16+CD56+ que expresaban el marcador de activación CD69.

4.5.8 Inmunoblotting sobre electroforesis bidimensional de proteínas de rotavirus

4.5.8.1 Preparación del extracto proteico de rotavirus

Se centrifugó 1 ml de suspensión de rotavirus salvaje (10×10^6 PFU/ml) a 5000 g durante 5 minutos y resuspender el pellet en mismo volumen de tampón de lavado 2-D (Bio-Rad, Múnich GE) calentado a 37°C. Se repitió este proceso tres veces para eliminar proteasas extracelulares. Posteriormente se añadieron 150 μ l de tampón de solubilización SDS a 95°C al pellet y se sometió a un vortex. Tras la homogenización se realizó sonicación de la muestra 10 veces durante 1 segundo a 60W y 20kHz y se incubó la solución a 95°C durante 5 minutos. Al finalizar el periodo de incubación se enfrió la muestra a 20°C y se diluyó con 500 μ l de tampón de muestra 2-D (Bio-Rad, Múnich GE) Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos tras lo cual se centrifugó la muestra a 14000g durante 30 minutos a 20°C y se recogió el sobrenadante proteico. Se ajustó la concentración de proteínas virales a aproximadamente 5 μ g/ μ l

4.5.8.2 Purificación de la muestra

Se empleó el kit ReadyPrep®2-D Cleanup Kit de BioRad para eliminar posibles contaminantes en la muestra. Se transfirieron 100 μ l de la solución proteica en un tubo microcentrífuga 1,5 ml y se añadieron 300 μ l del agente precipitante 1. Tras la homogenización de la solución, se incubó en hielo durante 15 minutos. Posteriormente se añadieron 300 μ l del agente precipitante 2 a la mezcla y se homogenizó vigorosamente. Se centrifugó el tubo a 12000g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante usando una pipeta. Se añadieron 40 μ l de reactivo de lavado 1 al pellet y se centrifugó el tubo a 12000g durante

5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 25 μ l de agua ultrapura ReadyPrep (BioRad Múnich GE) al pellet proteico. Se añadieron 1 ml de reactivo de lavado 2 enfriado a -20°C y 5 μ l de aditivo de lavado. El tubo se sometió a un vortex durante 1 minuto para homogenizar la solución y posteriormente se incubó a -20°C durante 30 minutos. Tras el periodo de incubación se centrifugó el tubo a 12000g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el pellet proteico al aire durante 5 minutos, tras lo cual se resuspendió el pellet en tampón de rehidratación 2-D

4.5.8.3 Isoelectroenfoque (IEF)

Se empleó el sistema PROTEAN i12[®] de BioRad para realización de la primera separación proteica mediante isoelectroenfoque (IEF) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Se introdujo un volumen equivalente a 100 μ gr de proteínas de rotavirus resuspendidos en tampón de rehidratación 2-D en el gradiente de pH inmovilizado (IPG ReadyStrips, 7 cm, pH 3-10, BioRad) en el sistema de IEF. Durante la rehidratación activa a 50 V, 20°C durante 16 horas, la corriente se limitó a 70 μ A. Se ajustó el protocolo de gradiente de IEF según instrucciones del proveedor (1: mantener a 150V durante 1 hora; 2: mantener a 300V durante 1 hora; 3: subida a 1000 V en 1 hora; 4: subir a 3000 V en 2 horas; 5: mantener a 3000 V durante 2 horas) a una temperatura de 20°C

4.5.8.4 *Electroforesis en gel*

Tras el IEF, las proteínas se redujeron directamente en tampón de muestra, conteniendo 50mM DTT. Para la separación de las proteínas en la segunda dimensión, las tiras de IPG se colocaron en la parte superior del gel de poliacrilamida (4%-12%, 1.0 mm) empleando 4 μ l de Estándar de Proteínas (Dual Color Protein Standard III, Serva) como marcador de peso molecular. La electroforesis se desarrolló en tampón XT-MES (BioRad, Múnich GE) a 180V.

4.5.8.5 *Inmunoblotting*

El gel resultante se equilibró en tampón XT-MES durante 10 minutos, tras lo cual las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Millipore, Darmstadt, GE) en tampón de transferencia en un sistema XCell II Blot (Thermo Fisher Scientific) a 30V durante 15 minutos. Tras la transferencia, la membrana de PVDF se bloqueó durante 30 minutos en tampón de bloqueo EveryBlot (BioRad, Múnich GE) tras lo cual se incubó durante 24 horas con pool de suero pacientes diluido 1:500 en tampón de bloqueo. Tras el periodo de incubación, la membrana de PVDF fue lavada cinco veces durante 5 minutos en PBS-Tween20 0,1%. El anticuerpo secundario usado fue el IRDye 800 CW Goat anti-human IgA (LI-COR)

La membrana fue digitalizada empleando un escáner Odyssey de infrarrojo cercano (LI-COR) a 800 nm longitud de onda.

4.6 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos empleados en el presente trabajo de investigación fueron realizados con el software Prism 6.0 para Mac (GraphPad La Jolla CA) y el paquete estadístico R. Los datos son reportados como se indica en el pie de cada gráfica. Se empleó el test de Mann-Whitney para las comparaciones entre pacientes de diferentes grupos y el test de suma de rangos de Wilcoxon para las comparaciones entre pacientes del mismo grupo. Se consideró el valor de $p \leq 0.05$ como el umbral nominal de significación estadística. Se emplearon los análisis no paramétricos en todos los casos dado que los datos no se ajustaban a distribución normal. Para cuantificar las asociaciones entre los parámetros clínicos y los valores de citocinas se empleó el coeficiente de correlación de rango de Spearman. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante la prueba Kruskal-Wallis.

5 RESULTADOS

5.1 Estudio de la respuesta humoral en la mucosa oral en respuesta a la infección natural y en la vacunación: comparación con la respuesta sistémica

5.1.1 Análisis de RV-IgA en muestras de suero/saliva en la cohorte de pacientes infectados

Se procedió al análisis de anticuerpos IgA específicos frente al rotavirus (RV-IgA) en muestra de **saliva** y **suero** en la cohorte de pacientes con infección natural (n=10), tomadas en fase aguda (ingreso hospitalario) y durante el periodo de convalecencia (tres meses tras la recuperación clínica) Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

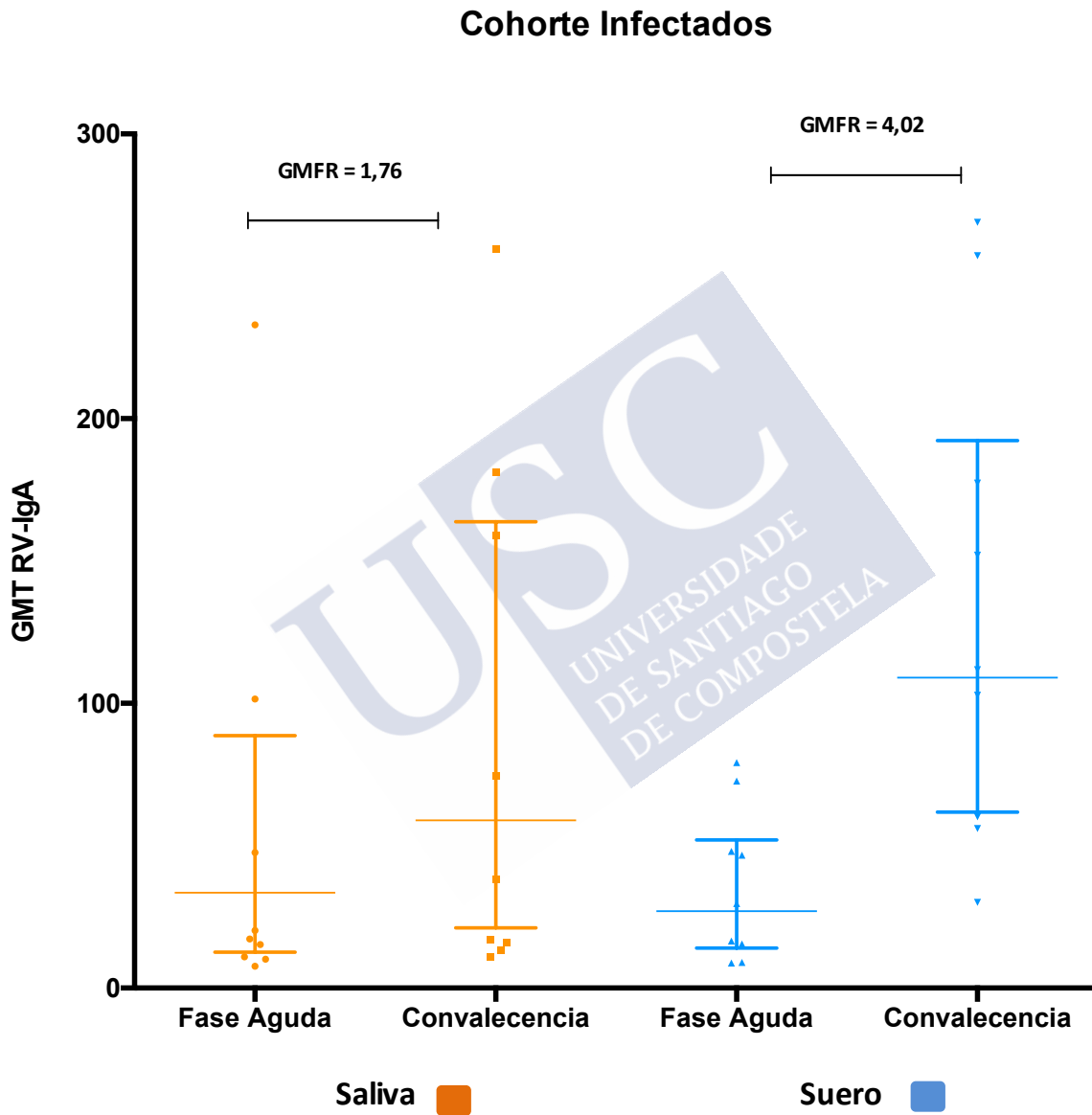
Antígeno	Parámetro	Saliva (N = 10)			Suero (N = 10)		
		n	Respuesta	95% IC	n	Respuesta	95% IC
RV-IgA	GMT Fase Aguda	10	33,46	(12,63 – 88,62)	10	27,05	(14,07 – 52,04)
	GMT Convalecencia	10	58,90	(21,19 – 163,8)	10	109,0	(61,83 – 192,3)
	GMFR	10	1,76	(0,73 – 4,21)	10	4,02	(2,16 – 7,48)

N = número de sujetos de la cohorte
n = número de sujetos con muestra analizada
GMT = Geometric Mean Titer
IC = Intervalo de confianza
GMFR = Geometric Mean Fold Rise

Tabla 1: Inmunogenicidad para Anti-rotavirus IgA en suero y saliva de la cohorte INFECTADOS.

El porcentaje de individuos que mostraron seroconversión con $GMFR \geq 1$ para muestra de saliva fue 60% (6/10) mientras que con $GMFR \geq 3$ para muestra de suero fue 70% (7/10)

En la siguiente gráfica se representan los valores de GMT obtenidos:



Gráfica 1: Representación de los valores de GMT (IC 95%) para RV-IgA obtenidos en muestra de saliva y suero en la cohorte infectados en Fase Aguda (hospitalización) y Convalecencia (al menos 3 meses tras recuperación clínica) junto con los valores de GMFR para cada muestra

GMT: Geometric Mean Titer; IC: Intervalo de confianza; GMFR: Geometric Mean Fold Rise

5.1.2 Análisis de RV-IgA en muestras de suero/saliva en la cohorte de pacientes vacunados

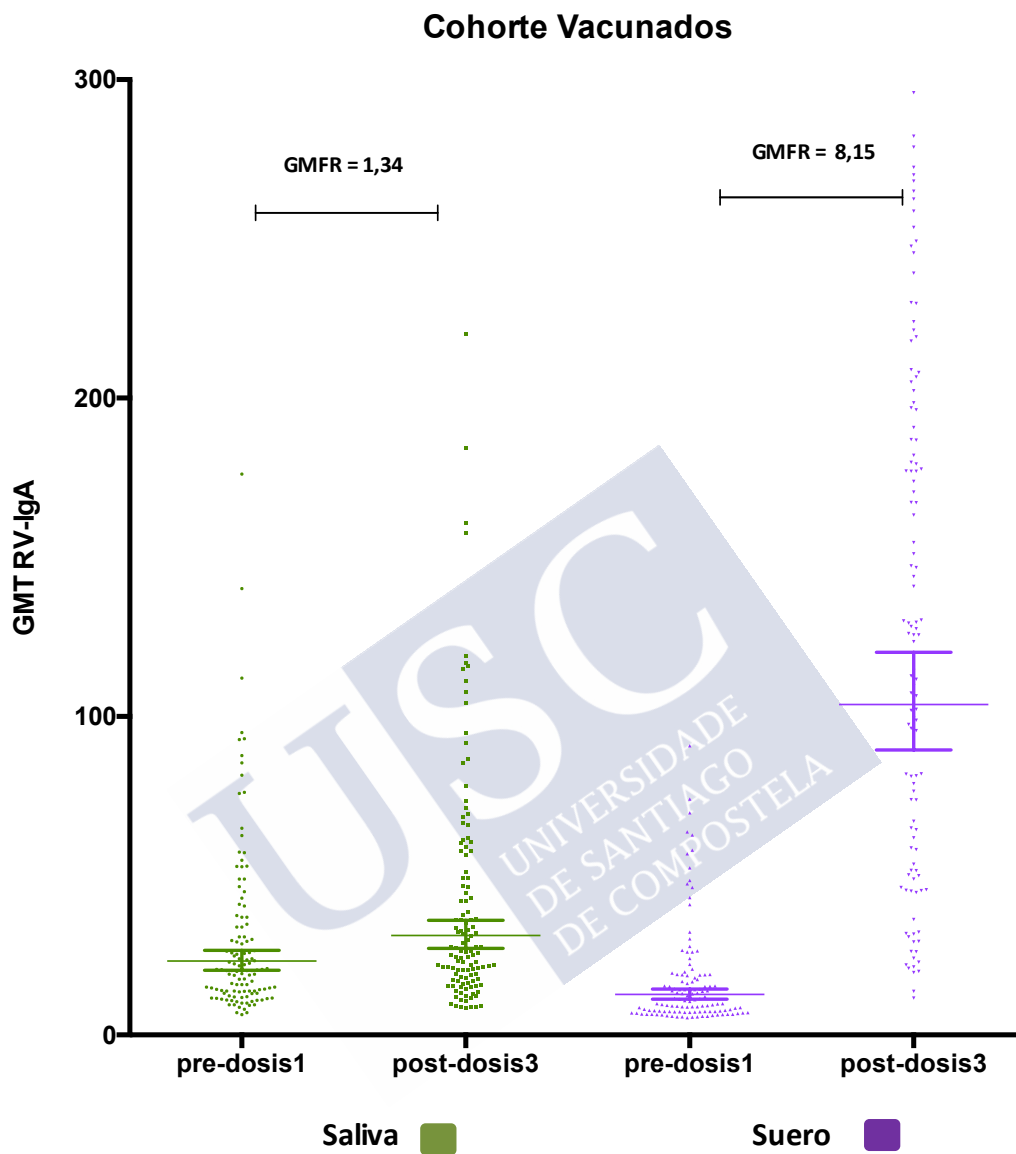
Se procedió al análisis de anticuerpos IgA específicos frente al rotavirus (RV-IgA) en muestra de **saliva** y **suero** en la cohorte de pacientes vacunados, realizándose el estudio antes de la primera dosis (Pre-dosis 1) y 40 días tras recibir la 3^a dosis de vacuna (Post-dosis 3) Los resultados se muestran en la siguiente Tabla:

Antígeno	Parámetro	Saliva (N = 121)			Suero (N = 121)		
		n	Respuesta	95% IC	n	Respuesta	95% IC
RV-IgA	GMT Pre-Dosis 1	121	23,25	(20,33 – 26,60)	121	12,71	(11,24 – 14,38)
	GMT Post-Dosis 3	121	31,28	(27,19 – 35,99)	121	103,7	(89,53 – 120,2)
	GMFR	121	1,34	(1,14 – 1,58)	121	8,15	(6,97 – 9,54)
N = número de sujetos de la cohorte n = número de sujetos con muestra analizada GMT = Geometric Mean Titer IC = Intervalo de confianza GMFR = Geometric Mean Fold Rise							

Tabla 2: Inmunogenicidad para Anti-rotavirus IgA en suero y saliva de la cohorte VACUNADOS.

El porcentaje de individuos que mostraron seroconversión con $GMFR \geq 1$ para muestra de saliva fue 66,94% (81/121) mientras que con $GMFR \geq 3$ para muestra de suero fue 89,25% (108/121)

En la siguiente gráfica se representan los valores de GMT obtenidos:



Gráfica 2: Representación de los valores de GMT (IC 95%) para RV-IgA obtenidos en muestra de saliva y suero en la cohorte de pacientes vacunados antes de la primera dosis (pre-dosis 1) y 40 días tras la toma de la 3ª dosis (post-dosis 3), junto con los valores de GMFR para cada muestra

GMT: Geometric Mean Titer; IC: Intervalo de confianza; GMFR: Geometric Mean Fold Rise

5.1.2.1 Desglose de resultados según el tipo de lactancia del paciente vacunado

Dada la probable interferencia que puede representar la presencia de anticuerpos de la leche materna en los análisis se realizó un análisis desglosado según el tipo de lactancia en el momento de la toma de muestra: **Fórmula**, **Materna** y **Materna/Fórmula** (lactancia materna en muestra pre-dosis 1 y fórmula en muestra post-dosis 3)

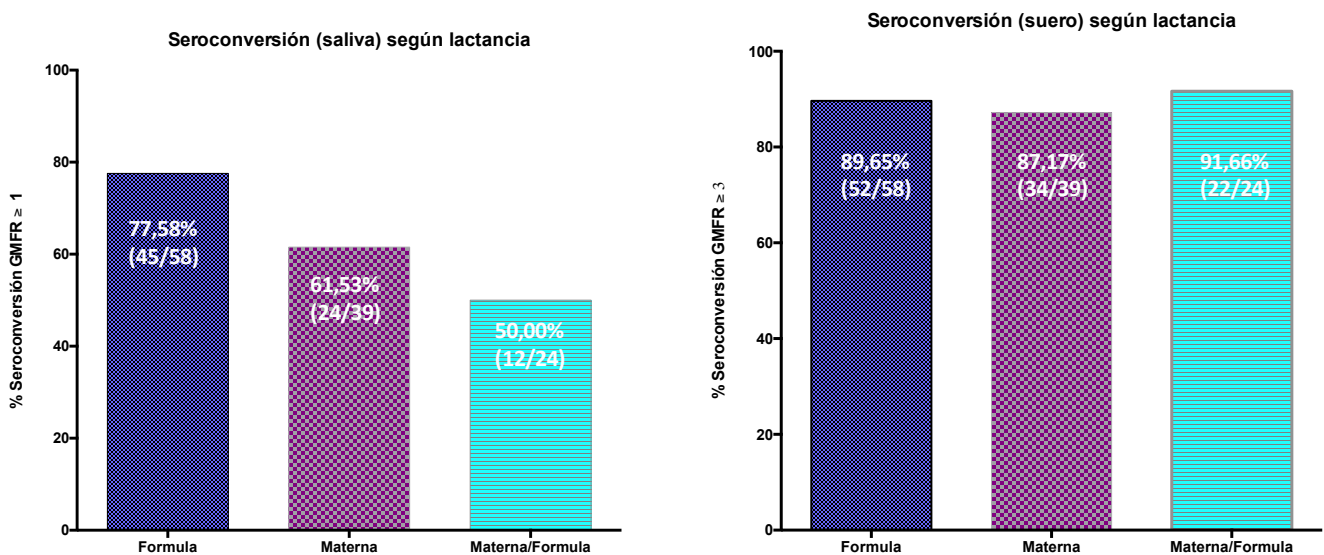
Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Antígeno	Parámetro	Saliva (N = 121)			Suero (N = 121)		
		n	Respuesta	95% IC	n	Respuesta	95% IC
RV-IgA	Fórmula						
	GMT Pre-Dosis 1	58	19,24	(16,34 – 22,65)	58	17,50	(14,65 – 20,90)
	GMT Post-Dosis 3	58	31,80	(26,33 – 38,41)	58	116,2	(94,24 – 143,2)
	GMFR	58	1,65	(1,34 – 2,02)	58	8,00	(6,68 – 9,57)
	Materna						
	GMT Pre-Dosis 1	39	25,55	(20,20 – 32,33)	39	8,65	(7,21 – 10,38)
	GMT Post-Dosis 3	39	32,54	(24,65 – 42,94)	39	91,06	(68,50 – 121,1)
	GMFR	39	1,27	(0,93 – 1,73)	39	10,51	(7,68 – 14,39)
	Materna/Fórmula						
	GMT Pre-Dosis 1	24	31,82	(21,24 – 47,68)	24	11,17	(8,88 – 14,05)
GMT Post-Dosis 3	24	28,03	(19,33 – 39,43)	24	98,25	(71,00 – 135,9)	
GMFR	24	0,88	(0,56 – 1,38)	24	8,79	(6,28 – 12,29)	

N = número de sujetos de la cohorte
n = número de sujetos con muestra analizada
GMT = Geometric Mean Titer
IC = Intervalo de confianza
GMFR = Geometric Mean Fold Rise

Tabla 3: Desglose de resultados de inmunogenicidad según el tipo de lactancia en la cohorte de pacientes VACUNADOS

El porcentaje de individuos que mostraron seroconversión con $GMFR \geq 1$ para muestra de saliva fue 77,58% (45/58) para el grupo de Fórmula, 61,53% (24/39) para el grupo de Materna y 50,00% (12/24) para el grupo de Materna/Fórmula. En las muestras de suero el porcentaje de individuos que mostraron seroconversión con $GMFR \geq 3$ fue 89,65% (52/58) para el grupo de Fórmula, 87,17% (34/39) para el grupo de Materna y 91,66% (22/24) para el grupo de Materna/Fórmula. Datos representados en el siguiente gráfico:



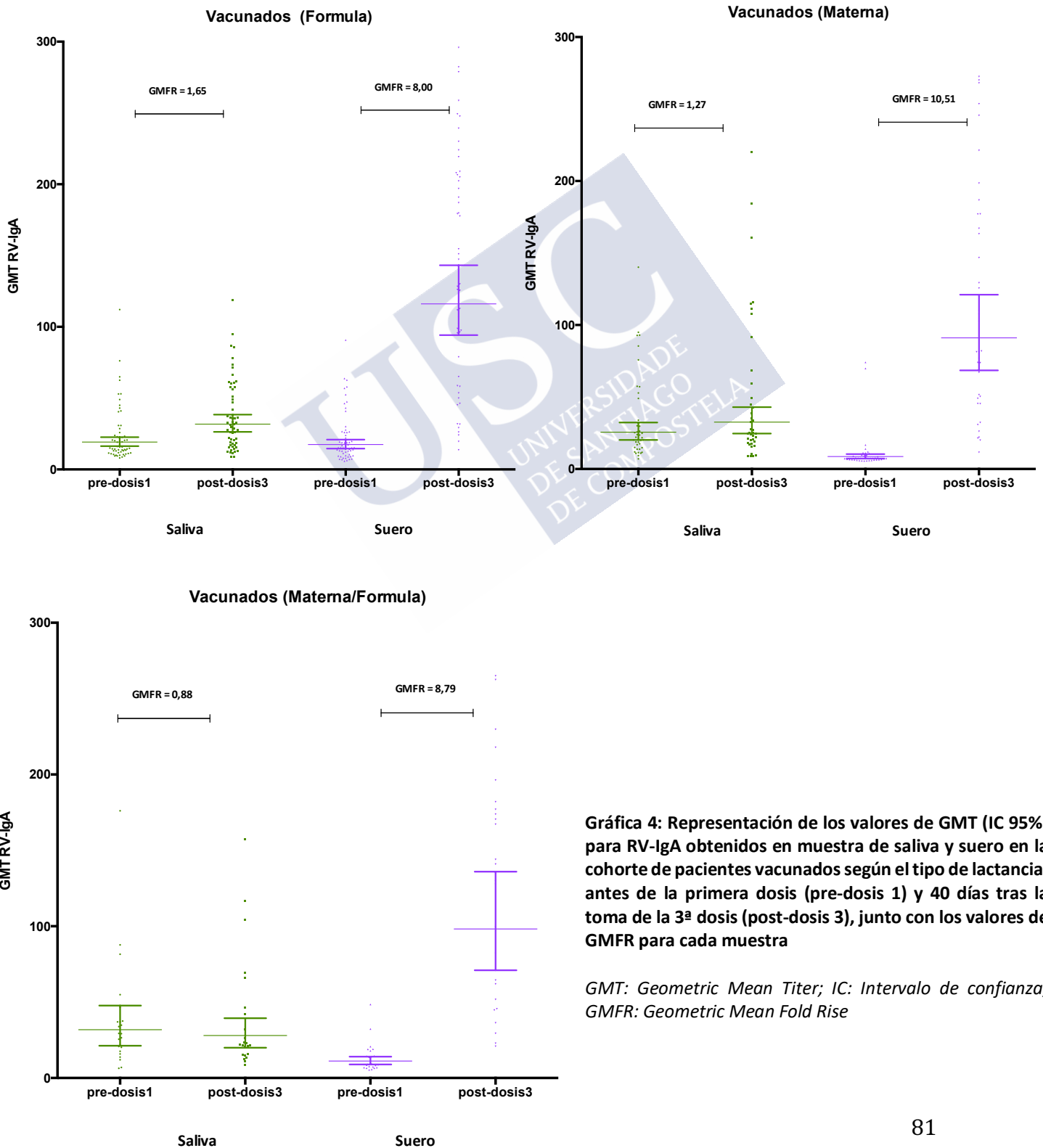
Gráfica 3: Representación de las diferencias en los valores de seroconversión en saliva ($GMFR \geq 1$) y suero ($GMFR \geq 3$) según el tipo de lactancia

GMFR: Geometric Mean Fold Rise

Estos datos muestran que la lactancia materna no afecta a la tasa de seroconversión medida en el suero, pero sí afecta a la tasa de seroconversión medida en saliva, debido a la propia interferencia de los Ac anti RV-IgA presentes en la leche materna y que son detectados en la muestra de saliva del niño. Esta interferencia se presenta en todas las muestras de saliva obtenidas durante la lactancia materna (Pre-dosis1/Post-Dosis 3 en el grupo Materna y Pre-Dosis 1

en el grupo Materna/Fórmula) no permitiendo realizar un cálculo correcto de la tasa de seroconversión en estos grupos.

En cuanto a los valores de GMT obtenidos en los diferentes grupos de lactancia, se representan en la siguiente Gráfica 4:



Gráfica 4: Representación de los valores de GMT (IC 95%) para RV-IgA obtenidos en muestra de saliva y suero en la cohorte de pacientes vacunados según el tipo de lactancia, antes de la primera dosis (pre-dosis 1) y 40 días tras la toma de la 3ª dosis (post-dosis 3), junto con los valores de GMFR para cada muestra

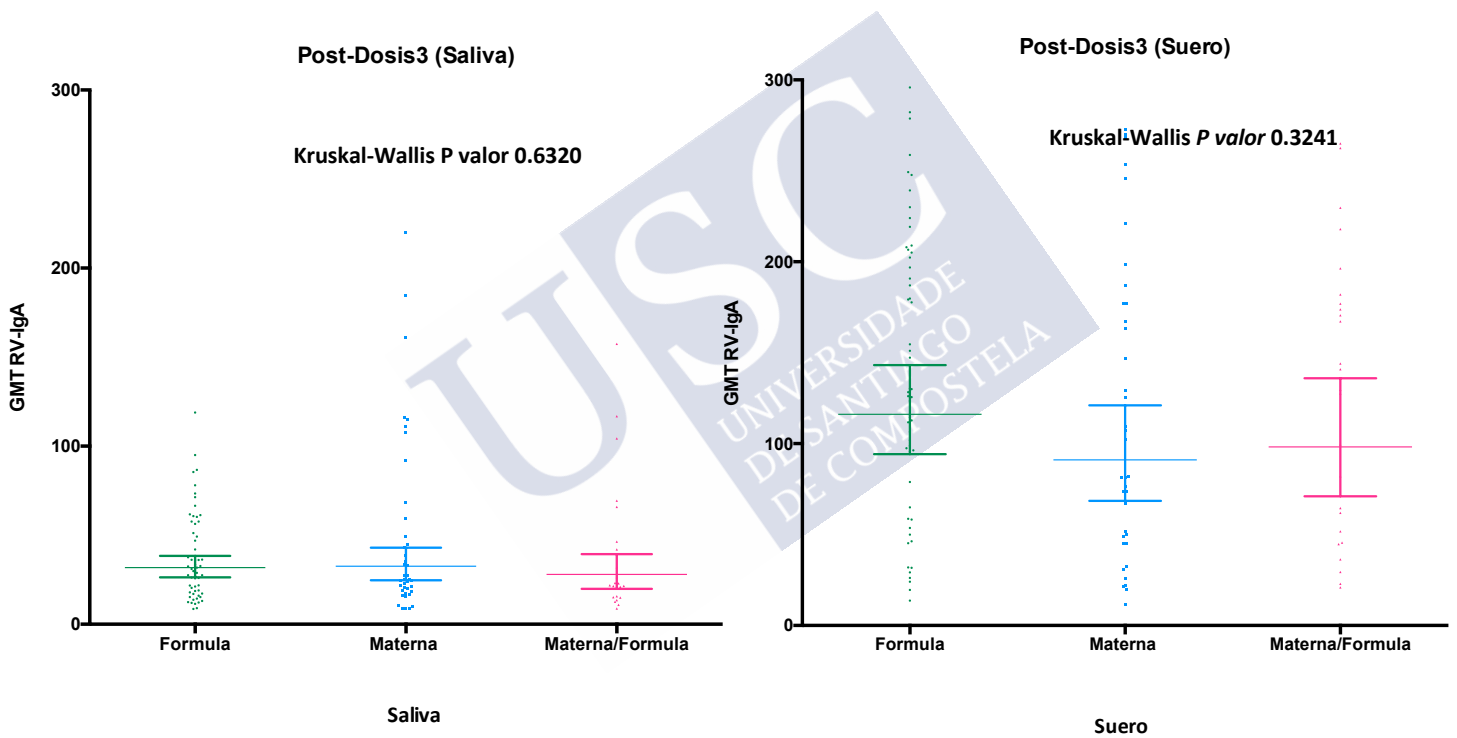
GMT: Geometric Mean Titer; IC: Intervalo de confianza; GMFR: Geometric Mean Fold Rise

De igual modo que antes, aquellos valores de GMT obtenidos en las muestras Pre-Dosis 1/Post-Dosis 3 del grupo Materna y Pre-Dosis 1 en el grupo Materna/Fórmula, muestran interferencia por presencia de Ac anti RV-IgA procedente de la leche materna, lo que no permite en estos grupos hacer una estimación real de los valores GMT obtenidos a través de la vacunación.



5.1.3 Análisis de la influencia de la lactancia sobre la inmunogenicidad de la vacunación y el GMFR

Para estudiar si el tipo de lactancia tiene algún efecto significativo sobre la inmunogenicidad de la vacuna, realizamos un análisis comparativo entre los GMT para RV-IgA alcanzados tras 40 días de toma de la última dosis de vacuna (Post-Dosis 3) (Gráfica 5)

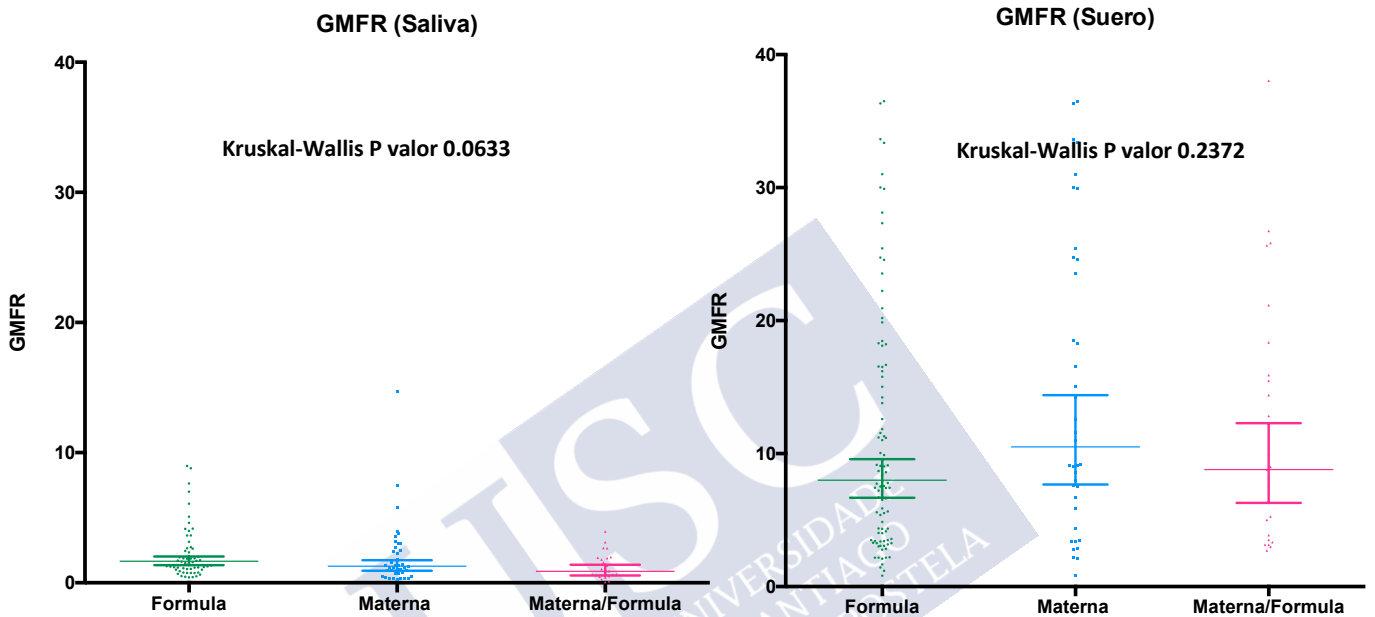


Gráfica 5: Análisis comparativo de los valores de GMT (IC 95%) para RV-IgA obtenidos en muestra de saliva y suero entre los diferentes grupos de lactancia: Fórmula, Materna y Materna/Fórmula

GMT: Geometric Mean Titer; IC: Intervalo de confianza

La prueba estadística empleada (Kruskal-Wallis) no muestra diferencias significativas en los valores de GMT RV-IgA alcanzados en los diferentes grupos de lactancia y en ambas muestras.

Asimismo, también realizamos un análisis comparativo del GMFR en las muestras de saliva y suero entre los diferentes grupos de lactancia (Gráfica 6)



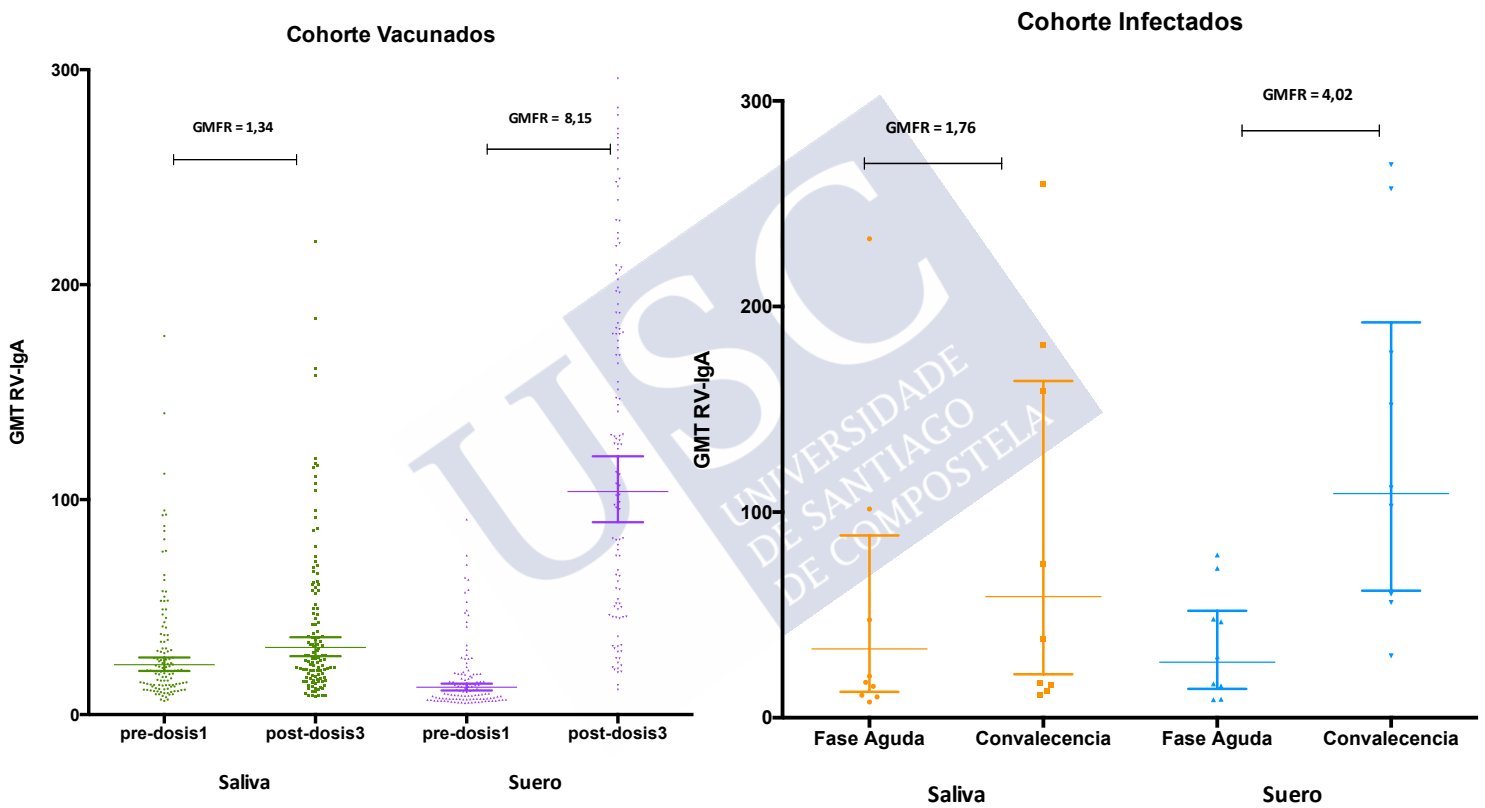
Gráfica 6: Análisis comparativo de los valores de GMFR obtenidos en muestra de saliva y suero entre los diferentes grupos de lactancia: Fórmula, Materna y Materna/Fórmula

GMFR: Geometric Mean Fold Rise

El análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas en los valores de GMFR entre los diferentes grupos de lactancia en ambas muestras.

5.1.4 Comparación entre las cohortes de individuos vacunados e infectados

En el siguiente gráfico se representan los valores de GMT y GMFR para los Ac frente a RV-IgA obtenidos a través de la infección natural y a través de la vacunación:



Gráfica 7: Análisis comparativo entre los valores de GMT (IC 95%) y GMFR para Ac anti RV-IgA obtenido en la cohorte de infección natural y en la cohorte de vacunación

GMT: Geometric Mean Titer; IC: Intervalo de confianza; GMFR: Geometric Mean Fold Rise

Se realizó la prueba estadística de Mann-Whitney entre los valores correspondientes para cada grupo para conocer si existen diferencias significativas entre ambas cohortes:

Parámetro	Saliva			Suero		
	Vacunados (n=121)	Infectados (n=10)	Mann-Whitney	Vacunados (n=121)	Infectados (n=10)	Mann-Whitney
GMT Pre-1/F-Aguda	23,25 (20,33–26,60)	33,46(12,63 – 88,62)	<i>ns</i>	12,71(11,24 – 14,38)	27,05(14,07 – 52,04)	0.0064
GMT Post-3/Conval	31,28 (27,19–35,99)	58,90(21,19 – 163,8)	<i>ns</i>	103,7(89,53 – 120,2)	109,0(61,83 – 192,3)	<i>ns</i>
GMFR	1,34 (1,14–1,58)	1,76(0,73 – 4,21)	<i>ns</i>	8,15(6,97 – 9,54)	4,02(2,16 – 7,48)	0.0332

N = numero de sujetos de la cohorte
 GMT = Geometric Mean Titer
 GMFR = Geometric Mean Fold Rise
ns = diferencias no significativas

Tabla 4: Análisis de las diferencias de inmunogenicidad en suero y saliva entre la cohorte de individuos vacunados e infectados

Los resultados no muestran diferencias significativas entre los valores GMT iniciales y finales en muestras de **saliva** entre ambas cohortes.

Por el contrario, si se observan diferencias estadísticamente significativas en los valores **séricos** de GMT iniciales (Pre-Dosis 1 y Fase Aguda) ($P=0.0064$) y por extensión de los valores de GMFR ($P=0.0332$), entre ambas cohortes. Muy probablemente esta diferencia se deba a la diferencia de edad entre ambos grupos (ver Tabla 4). Sin embargo, no se observan diferencias en el valor de GMT final en el suero (Post-Dosis 3 y Convalecencia) alcanzado por ambas cohortes.

Hay que tener en cuenta en el análisis de los resultados la limitación que supone el bajo número de pacientes reclutados en la cohorte infectados.

5.1.5 Correlación entre las muestras de saliva y suero en ambas cohortes

Se realizó una correlación de Spearman entre los valores GMT RV-IgA obtenidos entre ambas muestras de suero/saliva para cada cohorte. Se representan en la siguiente tabla los valores p de correlación obtenidos para cada pareja de muestras:

COHORTE VACUNADOS					COHORTE INFECTADOS				
	Saliva Pre-Dosis 1	Saliva Post-Dosis 3	Suero Pre-Dosis 1	Suero Post-Dosis 3	Saliva F- Aguda	Saliva Conval	Suero F-Aguda	Suero Conval	
Saliva Pre-Dosis 1		0.003	0.837	0.619		0.088	0.912	0.810	
Saliva Post-Dosis 3	0.003		0.135	0.191	0.0088		0.313	0.843	
Suero Pre-Dosis 1	0.837	0.135		0.002	0.912	0.313		0.097	
Suero Post-Dosis 3	0.619	0.191	0.002		0.810	0.843	0.097		

Tabla 5: Correlación de Spearman entre muestras de suero/saliva en ambas cohortes

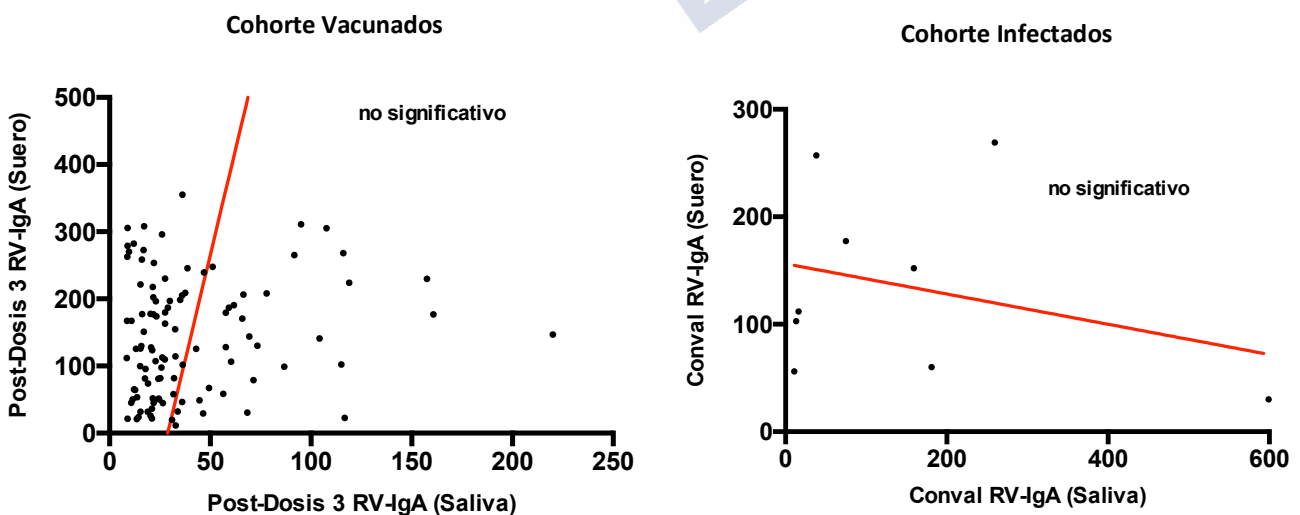


Gráfico 8: Asociación mediante correlación de Spearman entre los valores de GMT RV-IgA en Suero y Saliva en la cohorte de pacientes vacunados (Post-Dosis 3) y en la cohorte de pacientes infectados (Convalecencia)

Como se puede observar en ambas tablas y en el gráfico de asociación, no se observa correlación significativa alguna entre las muestras de suero y saliva en ambas cohortes, lo que indica compartimentos diferentes.



5.2 Estudio de la respuesta de citocinas en mucosa oral entre el paciente vacunado e infectado: comparación con la respuesta sistémica

5.2.1 Perfil de citocinas en suero y saliva en la cohorte de pacientes infectados

Mediante análisis multiparamétrico se analizó el perfil de 12 citocinas en suero y saliva del paciente reclutado en fase aguda y tras su recuperación en la convalecencia.

En la tabla siguiente se presentan los datos de concentración (pg/ml) de citocinas obtenidos:

Parámetro	Saliva (N = 27)			Suero (N = 20)		
	Fase Aguda (n=27)	Convalecencia (n=23)	Wilcoxon test	Fase Aguda (n=20)	Convalecencia (n=12)	Wilcoxon test
EGF	843,8 (317,8-1346)	338,4 (191,1-532)	0.0214	9,17 (5,87-32,32)	1,27 (0,06-5,33)	0.0078
IFN α_2	30,09 (11,93-69,59)	71,80 (18,46-221,5)	0.0192	6,21 (1,23-14,46)	0,0 (0,0-9,67)	ns
IL-8	387 (165,9-1510)	249,6 (121,7-418,4)	0.0319	19,34 (10,85-35,32)	8,49 (3,66-14,80)	0.0391
IL-1β	3,97 (1,94-19,82)	3,02 (1,78-4,59)	0.0319	5,79 (3,18-17,06)	0,01 (0,0-0,35)	0.0156
IL-15	2,68 (1,27-5,53)	2,27 (0,99-3,72)	ns	2,37 (1,31-5,31)	0,95 (0,72-2,04)	ns
IL-10	3,80 (0,61-15,15)	10,70 (3,30-15,40)	ns	70,0 (22,40-204,7)	14,62 (12,02-60,86)	0.0156
IL12	7,82 (3,01-17,76)	7,55 (2,85-20,66)	ns	1,15 (0,31-5,21)	0,53 (0,17-5,94)	0.0469
IL 6	1,98 (1,10-3,84)	1,12 (0,55-2,49)	0.0351	2,32 (1,41-4,49)	0,94 (0,25-3,85)	ns
TNF-α	2,61 (1,17-9,14)	2,89 (0,89-4,19)	ns	14,89 (7,95-20,37)	13,87 (11,57-27,78)	0.0313
IFN-γ	4,43 (1,88-7,24)	4,38 (2,69-8,03)	ns	5,78 (3,18-17,06)	1,27 (0,06-5,33)	0.007
IL-22	51,71 (4,53-186,6)	12,36 (2,71-17,53)	0.0161	119,8 (55,66-197,8)	31,90 (18,29-84,26)	ns
IFN-λ	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-

N = numero de sujetos de la cohorte
n = numero de sujetos con muestra analizada
n.d.= no detectable
EGF=Epidermal Growth Factor; IL=Interleucina; IFN=Interferon; TNF=Tumor Necrosis Factor

Tabla 6: Concentración de citocinas en saliva y suero en la cohorte de pacientes infectados (Fase Aguda y Convalecencia). Los datos representan la Mediana de las concentraciones (pg/ml) y el rango intercuartil 25%-75% El nivel de significancia calculado según el test de Wilcoxon (significativo < 0.005)

En el **Gráfico 9** se representan los valores obtenidos en la muestra de SALIVA en la cohorte de infectados:

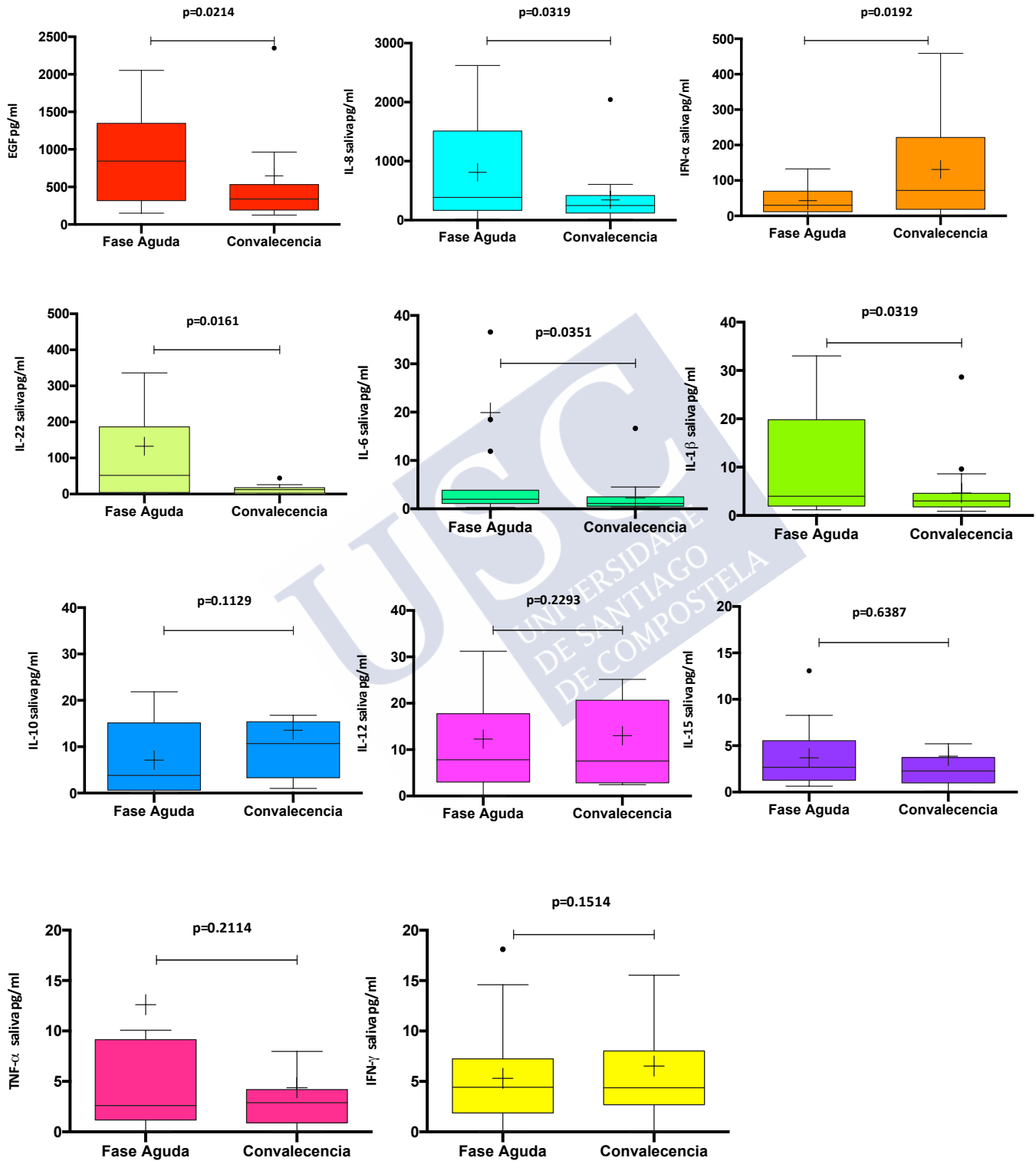


Gráfico 9: Concentración de citocinas en SALIVA en la cohorte de pacientes infectados en Fase Aguda y Convalecencia. Los datos representan la Mediana de las concentraciones (pg/ml) y el rango intercuartil 25%-75% (+ = Media)

En el **Gráfico 10** se representan los valores obtenidos en la muestra de SUERO en la cohorte de infectados:

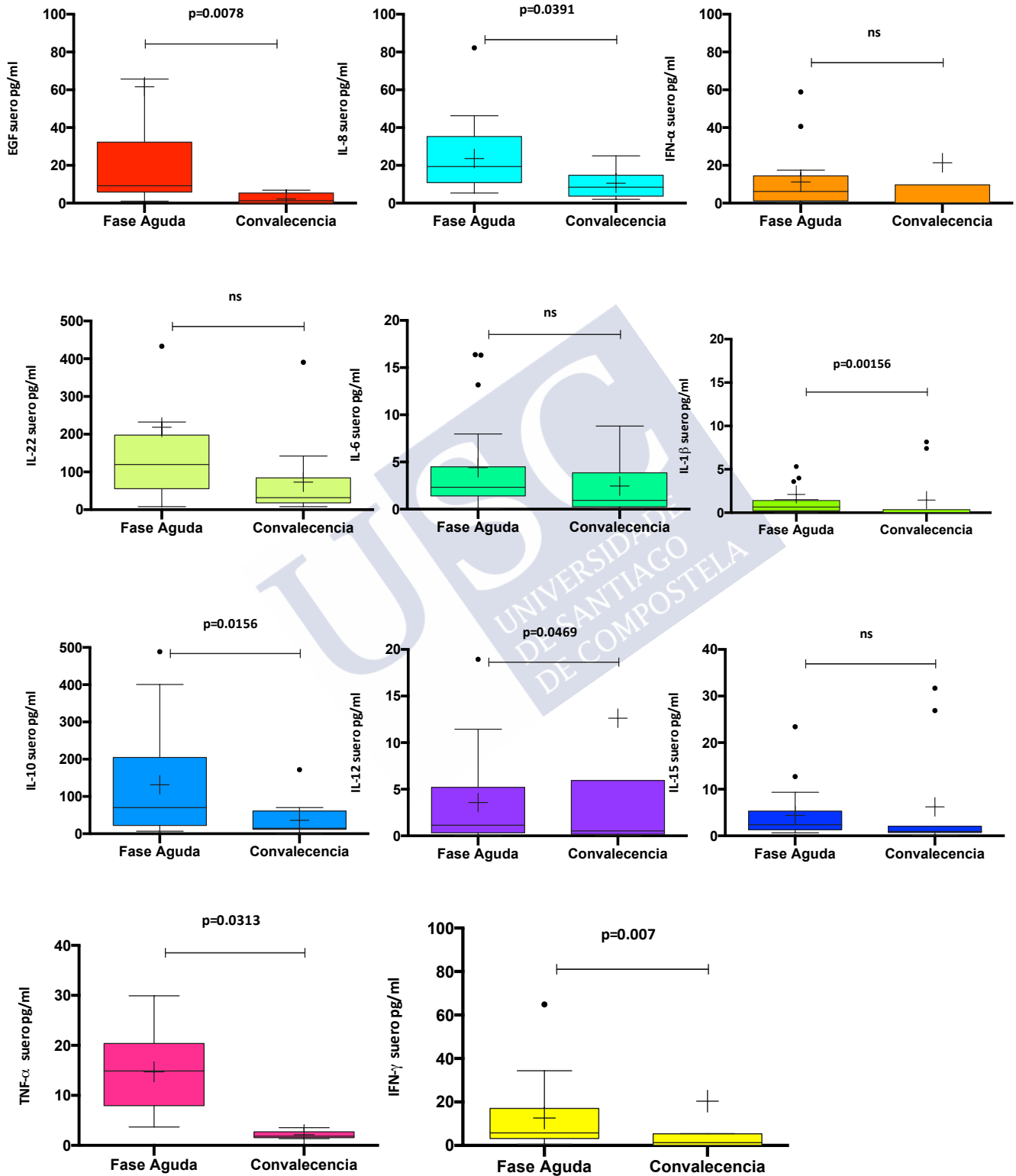


Gráfico 10: Concentración de citocinas en SUERO en la cohorte de pacientes infectados en Fase Aguda y Convalecencia. Los datos representan la Mediana de las concentraciones (pg/ml) y el rango intercuartil 25%-75% (+ = Media)

5.2.2 Perfil de citocinas en suero y saliva en la cohorte de pacientes vacunados

De igual modo se realizó este análisis multiparamétrico en muestras de suero y saliva para la cohorte de pacientes vacunados, con muestra tomada antes de la vacunación (Pre-Dosis 1) y 40 días tras la última dosis de vacuna (Post-Dosis 3).

Los valores de concentración obtenidos (pg/ml) se recogen en la Tabla 7:

Parámetro	Saliva (N = 36)			Suero (N = 36)		
	Pre-Dosis 1 (n=36)	Post-Dosis 3 (n=35)	Wilcoxon test	Pre-Dosis 1 (n=36)	Post-Dosis 3 (n=34)	Wilcoxon test
EGF	458,5 (272,3-522,5)	343,1 (255,4-429,5)	ns	1,19 (0,0-1,934)	2,88 (1,57-7,05)	ns
IFN α_2	216,1 (105,6-351,7)	233,8 (93,04-293,5)	ns	1,30 (0,54-2,19)	1,63 (0,98-2,39)	ns
IL-8	74,30 (48,95-187,1)	122,6 (74,41-182,4)	ns	2,00 (0,96-4,28)	4,20 (1,53-8,42)	ns
IL-1 β	1,62 (0,97-2,37)	2,00 (0,96-4,28)	ns	0,33 (0,11-1,09)	1,63 (0,98-2,37)	ns
IL-15	1,94 (0,86-3,84)	1,56 (0,74-2,55)	ns	4,59 (2,02-8,28)	1,74 (0,21-3,28)	ns
IL-10	13,66 (6,62-17,66)	8,27 (5,14-10,51)	ns	1,47 (0,63-3,71)	4,18 (2,12-8,18)	ns
IL12	3,91 (2,45-11,62)	2,19 (0,65-3,38)	ns	0,71 (0,39-1,49)	1,63 (0,97-2,37)	ns
IL 6	1,65 (0,97-2,97)	1,56 (0,74-2,55)	ns	1,08 (0,54-2,20)	2,07 (0,97-4,18)	ns
TNF- α	1,00 (0,54-2,19)	0,71 (0,39-1,49)	ns	2,07 (0,87-4,23)	1,53 (0,16-3,23)	ns
IFN- γ	4,59 (2,02-8,28)	6,78 (2,46-9,79)	ns	2,11 (0,96-4,28)	1,59 (0,16-3,23)	ns
IL-22	1,65 (0,97-2,97)	1,56 (0,74-2,55)	ns	4,56 (1,64-8,42)	1,94 (0,86-3,84)	ns
IFN- λ	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-

N = número de sujetos de la cohorte
n = número de sujetos con muestra analizada
n.d.= no detectable
EGF=Epidermal Growth Factor; IL=Interleucina; IFN=Interferon; TNF=Tumor Necrosis Factor

Tabla 7: Concentración de citocinas en saliva y suero en la cohorte de pacientes vacunados (Pre-Dosis 1 y Post-Dosis 3). Los datos representan la Mediana de las concentraciones (pg/ml) y el rango intercuartil 25%-75%. El nivel de significancia calculado según el test de Wilcoxon (significativo < 0.005)

Los valores obtenidos en la muestra de saliva para la cohorte de pacientes vacunados se representan en el **Gráfico 11**:

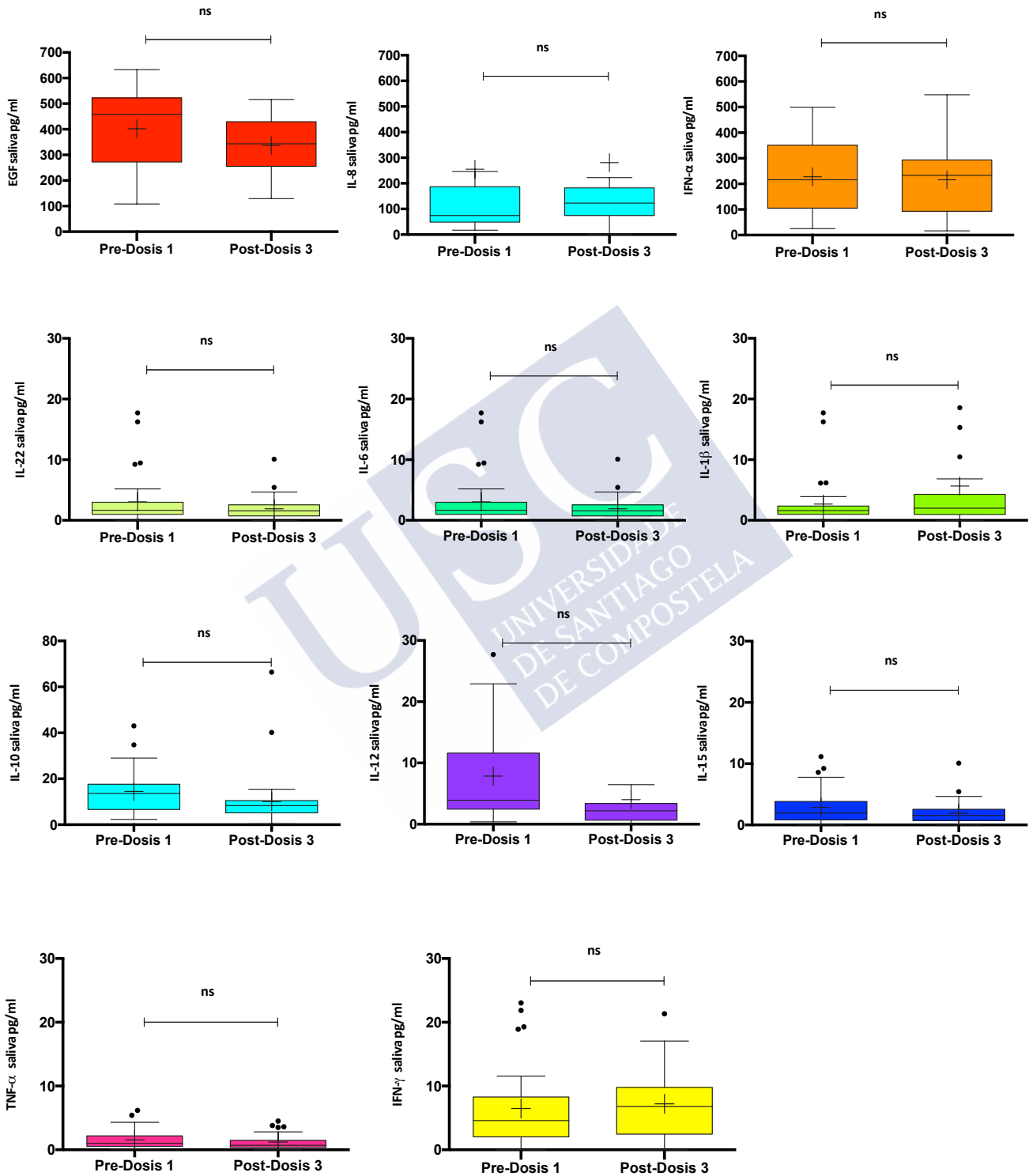


Gráfico 11: Concentración de citocinas en SALIVA en la cohorte de pacientes vacunados (Pre-Dosis 1 y Post-Dosis 3). Los datos representan la Mediana de las concentraciones (pg/ml) y el rango intercuartil 25%-75% (+ = Media)

Los valores obtenidos en la muestra de suero para la cohorte de pacientes vacunados se representan en el **Gráfico 12**:

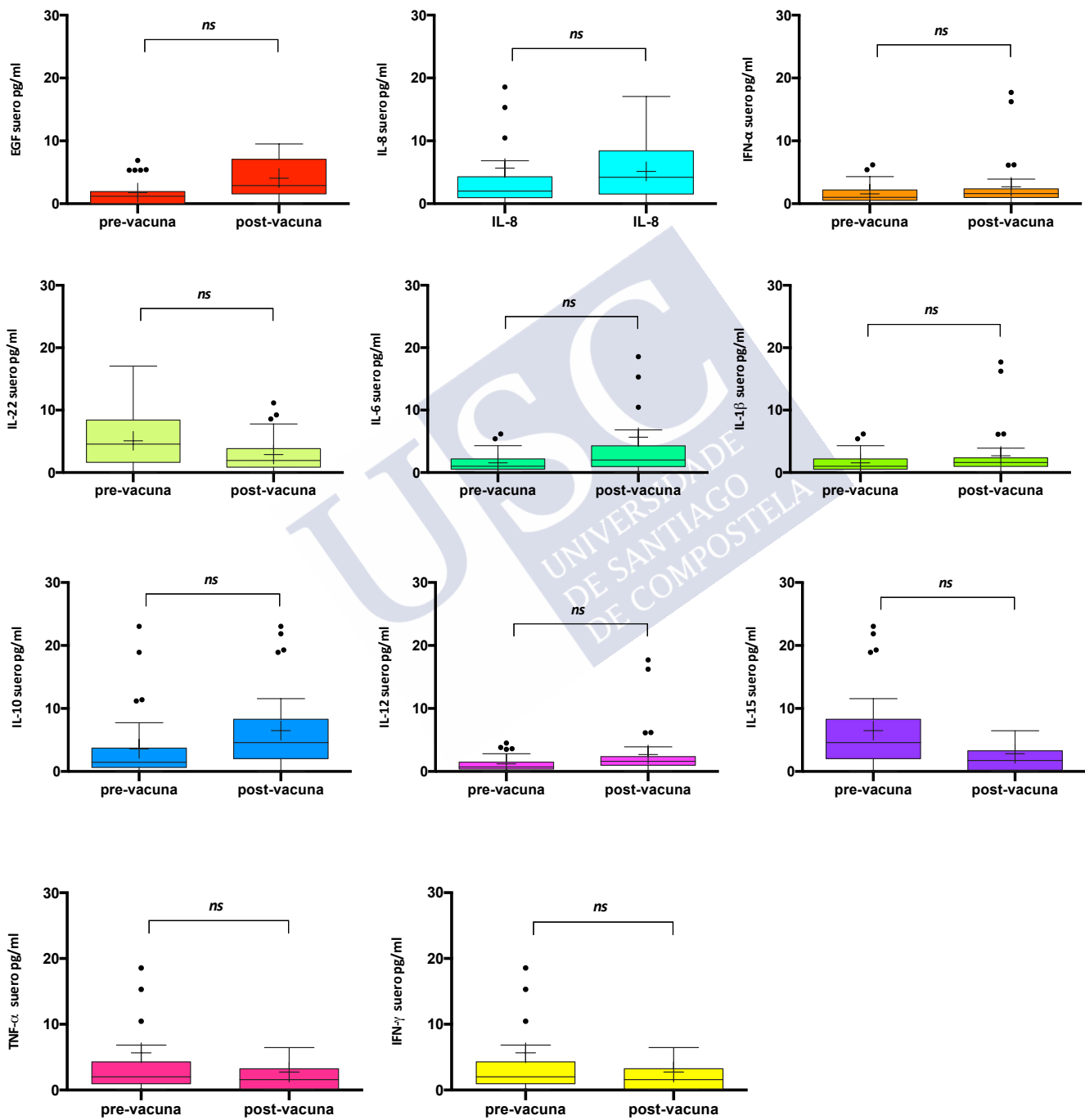


Gráfico 12: Concentración de citocinas en SUERO en la cohorte de pacientes vacunados (Pre-Dosis 1 y Post-Dosis 3). Los datos representan la Mediana de las concentraciones (pg/ml) y el rango intercuartil 25%-75% (+ = Media)

5.2.3 Análisis comparativo entre el perfil de citocinas de la cohorte de pacientes infectados y vacunados

Se realizó un análisis comparativo entre los perfiles de citocinas encontrados en ambas cohortes de pacientes vacunados e infectados para cada muestra empleada (Tabla 8)

Parámetro	Saliva			Suero		
	Vacunados	Infectados	Mann-Whitney	Vacunados	Infectados	Mann-Whitney
EGF Pre-1/F-Aguda	458,5 (272,3-522,5)	843,8 (317,8-1346)	0.0008	1,19 (0,0-1,934)	9,17 (5,87-32,32)	<0.0001
EGF Post-3/Conval	343,1 (255,4-429,5)	338,4 (191,1-532)	ns	2,88 (1,57-7,05)	1,27 (0,06-5,33)	Ns
IFN α_2 Pre-1/F-Aguda	216,1 (105,6-351,7)	30,09 (11,93-69,59)	<0.0001	1,30 (0,54-2,19)	6,21 (1,23-14,46)	0.0010
IFN α_2 Post-3/Conval	233,8 (93,04-293,5)	71,80 (18,46-221,5)	0.0039	1,63 (0,98-2,39)	0,0 (0,0-9,67)	0.0223
IL-8 Pre-1/F-Aguda	74,30 (48,95-187,1)	387 (165,9-1510)	<0.0001	2,00 (0,96-4,28)	19,34 (10,85-35,32)	<0.0001
IL-8 Post-3/Conval	122,6 (74,41-182,4)	249,6 (121,7-418,4)	0.0114	4,20 (1,53-8,42)	8,49 (3,66-14,80)	0.0235
IL-1 β Pre-1/F-Aguda	1,62 (0,97-2,37)	3,97 (1,94-19,82)	<0.0001	0,33 (0,11-1,09)	5,79 (3,18-17,06)	ns
IL-1 β Post-3/Conval	2,00 (0,96-4,28)	3,02 (1,78-4,59)	ns	1,63 (0,98-2,37)	0,01 (0,0-0,35)	0.0009
IL-15 Pre-1/F-Aguda IL-15 Post-3/Conval	1,94 (0,86-3,84) 1,56 (0,74-2,55)	2,68 (1,27-5,53) 2,27 (0,99-3,72)	ns ns	4,59 (2,02-8,28) 1,74 (0,21-3,28)	2,37 (1,31-5,31) 0,95 (0,72-2,04)	0.0818 Ns
IL-10 Pre-1/F-Aguda IL-10 Post-3/Conval	13,66 (6,62-17,66) 8,27 (5,14-10,51)	3,80 (0,61-15,15) 10,70 (3,30-15,40)	0.0003 ns	1,47 (0,63-3,71) 4,18 (2,12-8,18)	70,0 (22,40-204,7) 14,62 (12,02-60,86)	<0.0001 0.0029
IL12 Pre-1/F-Aguda IL12 Post-3/Conval	3,91 (2,45-11,62) 2,19 (0,65-3,38)	7,82 (3,01-17,76) 7,55 (2,85-20,66)	ns 0.0001	0,71 (0,39-1,49) 1,63 (0,97-2,37)	1,15 (0,31-5,21) 0,53 (0,17-5,94)	ns ns
IL 6 Pre-1/F-Aguda IL 6 Post-3/Conval	1,65 (0,97-2,97) 1,56 (0,74-2,55)	1,98 (1,10-3,84) 1,12 (0,55-2,49)	ns ns	1,08 (0,54-2,20) 2,07 (0,97-4,18)	2,32 (1,41-4,49) 0,94 (0,25-3,85)	0.0062 Ns
TNF- α Pre-1/F-Aguda TNF- α Post-3/Conval	1,00 (0,54-2,19) 0,71 (0,39-1,49)	2,61 (1,17-9,14) 2,89 (0,89-4,19)	0.0008 0.0084	2,07 (0,87-4,23) 1,53 (0,16-3,23)	14,89 (7,95-20,37) 13,87 (11,57-27,78)	<0.0001 <0.0001
IFN- γ Pre-1/F-Aguda IFN- γ Post-3/Conval	4,59 (2,02-8,28) 6,78 (2,46-9,79)	4,43 (1,88-7,24) 4,38 (2,69-8,03)	ns ns	2,11 (0,96-4,28) 1,59 (0,16-3,23)	5,78 (3,18-17,06) 1,27 (0,06-5,33)	0.0008 Ns
IL-22 Pre-1/F-Aguda IL-22 Post-3/Conval	1,65 (0,97-2,97) 1,56 (0,74-2,55)	51,71 (4,53-186,6) 12,36 (2,71-17,53)	0.0003 0.0002	4,56 (1,64-8,42) 1,94 (0,86-3,84)	119,8 (55,66-197,8) 31,90 (18,29-84,26)	<0.0001 <0.0001
IFN- λ Pre-1/F-Aguda IFN- λ Post-3/Conval	n.d. n.d.	n.d. n.d.	- -	n.d. n.d.	n.d. n.d.	- -

ns = diferencias no significativas
n.d. = valor no detectable

Tabla 8: Comparación de los niveles de citocinas entre las cohortes de vacunados e infectados en ambos tipos de muestras. Los datos representan la Mediana de las concentraciones (pg/ml) y el rango intercuartil 25%-75% Se empleó el test estadístico de Mann-Whitney para comprobar la significación de las diferencias (nivel de significancia P<0.05)

En el **Gráfico 13** se representan comparativamente los valores de citocinas obtenidos en la muestra de suero en ambas cohortes estudiadas:

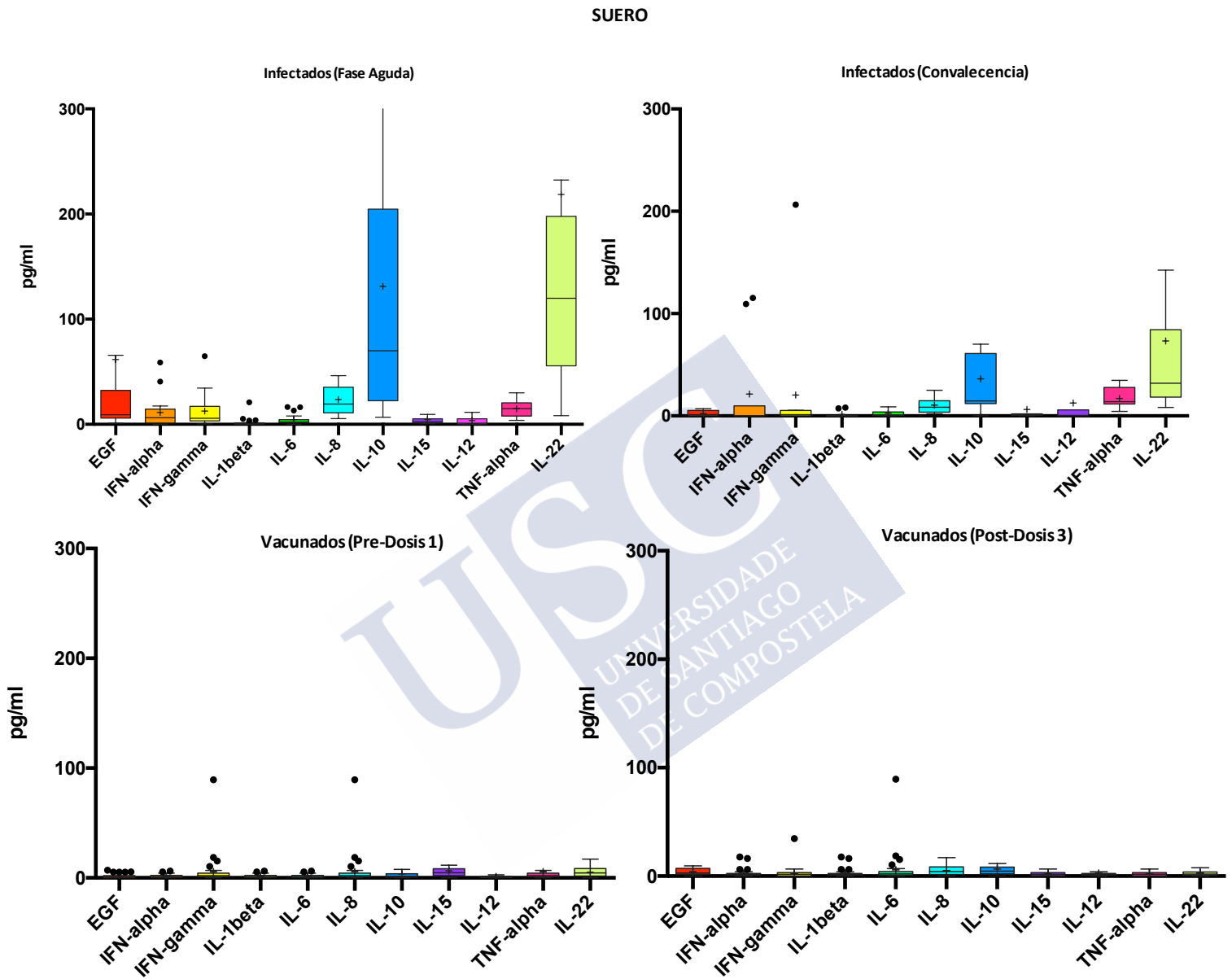


Gráfico 13: Análisis comparativo de niveles de citocinas en muestra de SUERO entre la cohorte Infectados vs Vacunado. Los datos representan la Mediana de las concentraciones (pg/ml) y el rango intercuartil 25%-75% (+ = Media)

En el **Gráfico 14** se representan comparativamente los valores de citocinas obtenidos en la muestra de saliva en ambas cohortes estudiadas:

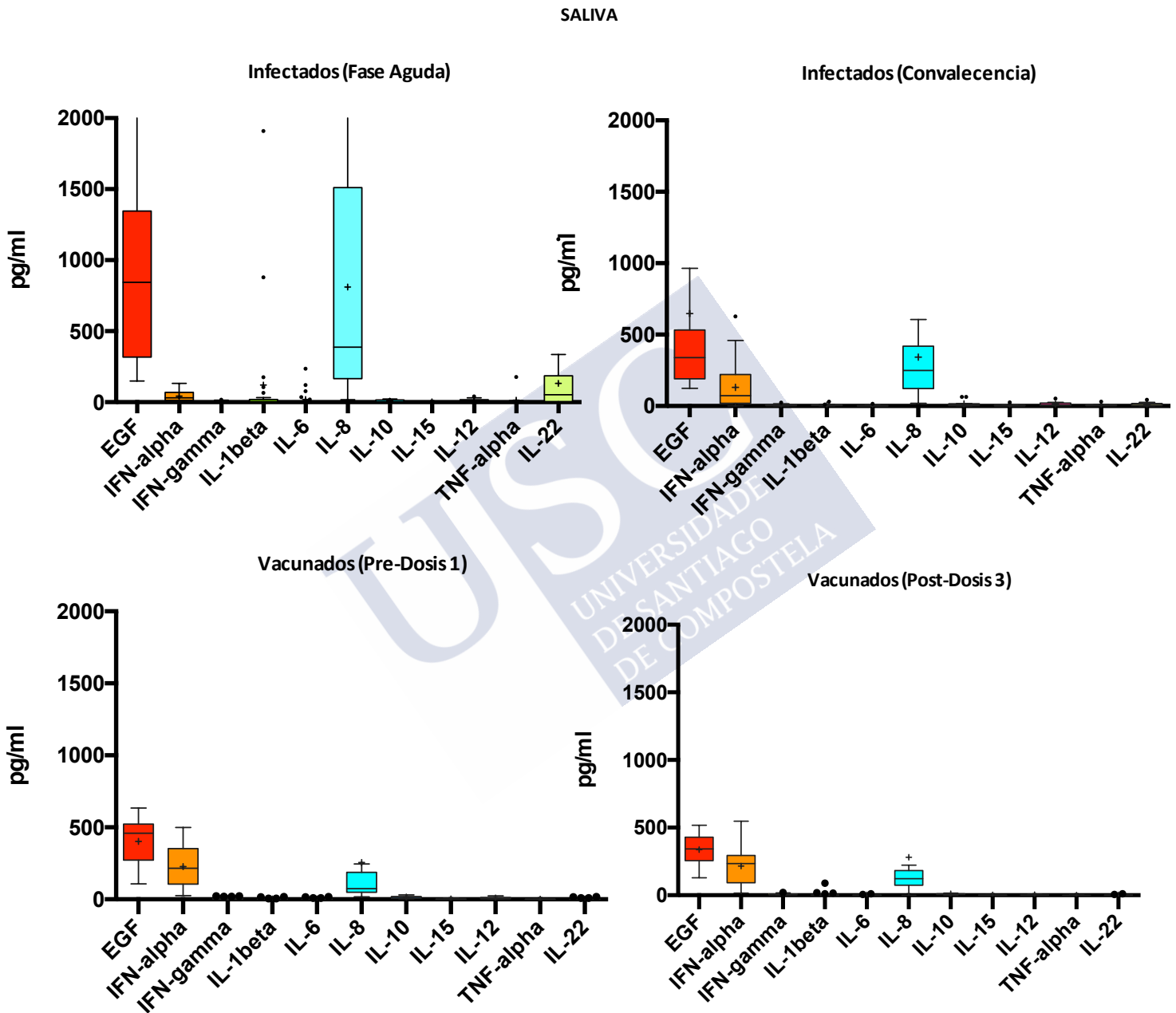


Gráfico 14: Análisis comparativo de niveles de citocinas en muestra de SALIVA entre la cohorte Infectados vs Vacunado. Los datos representan la Mediana de las concentraciones (pg/ml) y el rango intercuartil 25%-75% (+ = Media)

5.2.4 Correlación entre los valores de citocinas obtenidos y el curso clínico de los pacientes infectados

Con el objeto de buscar algún biomarcador en suero y/o saliva asociado al curso clínico de la enfermedad, se analizó la correlación entre los diferentes valores de citocinas obtenidos y diferentes parámetros clínicos recogidos en la cohorte infectados (n=27) en fase aguda de la enfermedad (Tabla 9)

Parámetros Clínicos	Fase Aguda
Score Vesikari	11,07 (3,485)
Días de Estancia Hospitalaria	5,750 (3,026)
Temperatura (°C)	38,70 (0,622)
Número de episodios de vómitos/día	3,179 (4,738)
Duración de los vómitos (días)	2,037 (1,931)
Número de deposiciones/día	4,929 (5,018)
Duración de la diarrea (días)	4,571 (2,168)
Nivel de deshidratación	1,607 (1,100)

Tabla 9: Características clínicas de los pacientes en Fase aguda expresados como Media (SD)

5.2.4.1 Correlación con los valores obtenidos en muestra de saliva

En la Tabla 10 siguiente se representan los valores p obtenidos mediante el test de Spearman para cada asociación de citocinas en SALIVA con los parámetros clínicos obtenidos en fase aguda de la enfermedad:

SALIVA	EGF	IFN- α	IFN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-15	IL-12	TNF- α	IL-22
Edad (Meses)	0,184	0,962	0,207	0,329	0,814	0,533	0,242	0,932	0,397	0,555	0,966
Estancia hospitalaria (días)	0,022	0,437	0,830	0,109	0,582	0,633	0,690	0,658	0,867	0,205	0,193
Duración Diarrea (días)	0,891	0,226	0,031	0,718	0,206	0,553	0,249	0,711	0,034	0,928	0,870
Nº deposiciones/día	0,273	0,199	0,783	0,149	0,690	0,605	0,585	0,472	0,511	0,644	0,513
Duración vómitos	0,634	0,220	0,128	0,614	0,225	0,859	0,114	0,559	0,343	0,618	0,224
Nº máx. vomitos/día	0,790	0,155	0,313	0,856	0,319	0,473	0,454	0,759	0,192	0,507	0,938
Temperatura	0,503	0,773	0,066	0,513	0,993	0,172	0,099	0,946	0,314	0,058	0,238
Nivel de Deshidratación	0,216	0,762	0,003	0,712	0,023	0,949	0,010	0,039	0,014	0,594	0,225
Score Vesikari	0,642	0,655	0,039	0,670	0,026	0,665	0,031	0,121	0,031	0,374	0,655

Tabla 10: Niveles de significación según el test de Spearman para la asociación de los niveles de citocinas obtenidos en fase aguda en SALIVA con los parámetros clínicos de los pacientes infectados. Se muestra en negrita aquellos valores p significativos (P<0.005)

Encontramos valores de citocinas en saliva con asociaciones significativas con parámetros clínicos: EGF con Estancia Hospitalaria ($r^2=-0.63$), IFN- γ , IL-6, IL-10 e IL-12 con el Score de Gravedad de Vesikari ($r^2=-0.39$, $r^2=-0.42$, $r^2=-0.41$ y $r^2=-0.41$ respectivamente)

En el **Gráfico 15** se muestran aquellos valores que muestran una asociación clínica significativa ($P<0.05$) mediante test de Spearman:

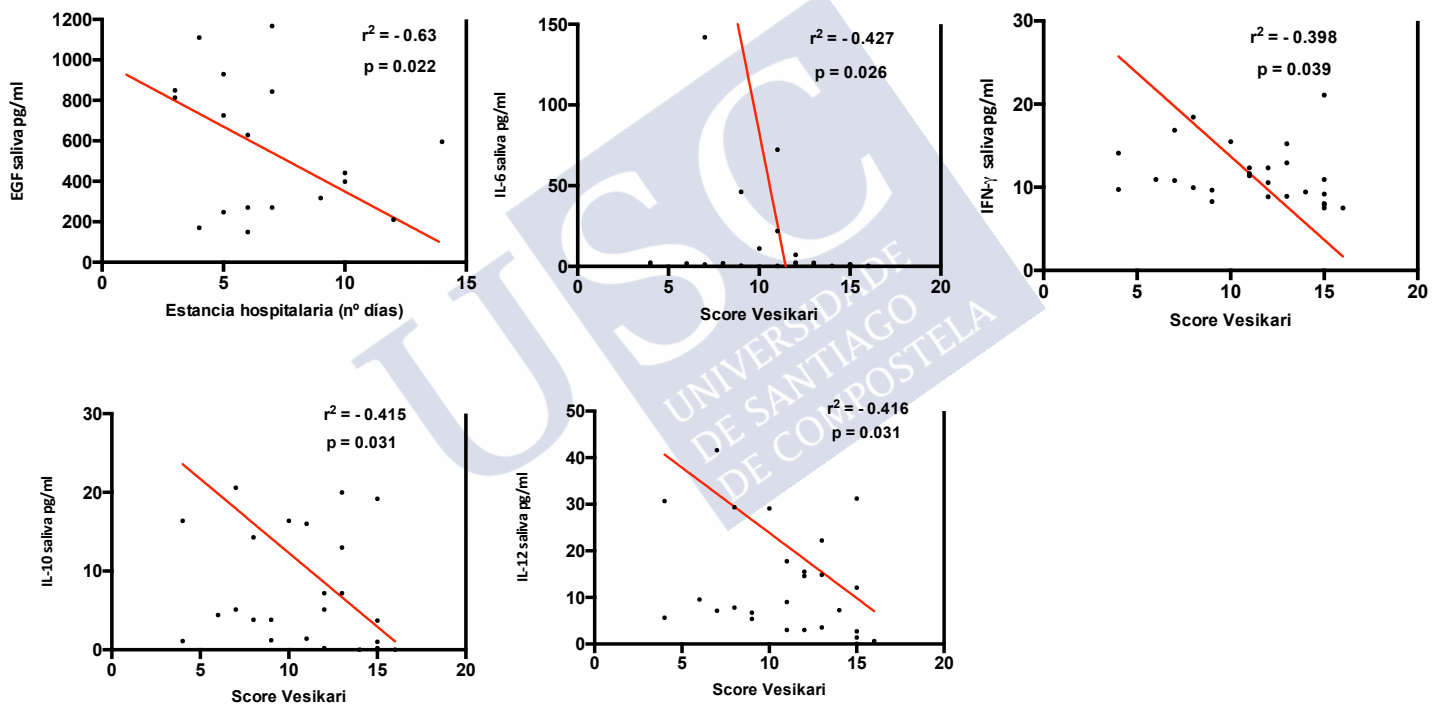


Gráfico 15: Asociación entre los valores de EGF, IFN- γ , IL-6, IL-12 e IL-10 en SALIVA (Fase Aguda) con los parámetros clínicos de Estancia Hospitalaria (días) y Score de gravedad de Vesikari.

5.2.4.2 Correlación con los valores obtenidos en muestra de suero

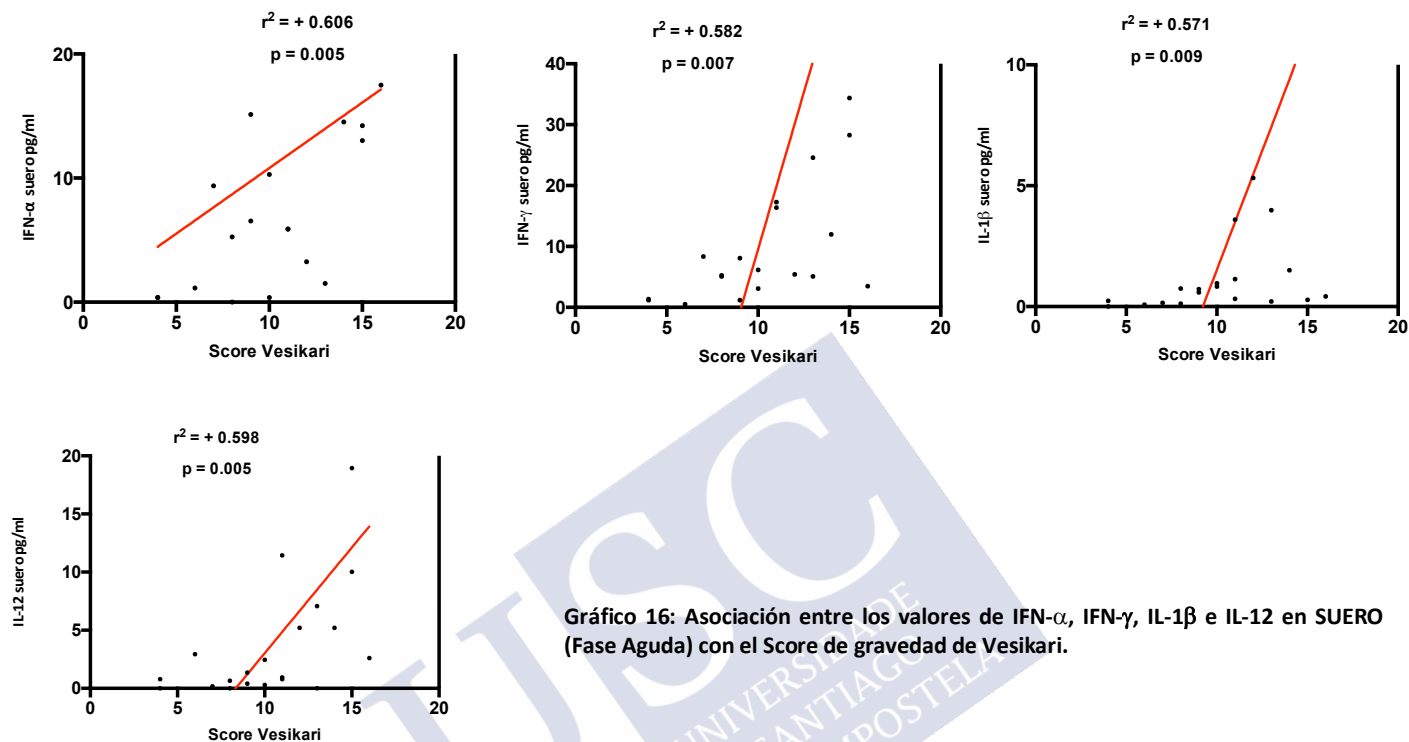
En la Tabla 11 siguiente se representan los valores p obtenidos mediante la prueba de Spearman para cada asociación de citocinas en suero con los parámetros clínicos obtenidos en fase aguda de la enfermedad:

SUERO	EGF	IFN- α	IFN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-15	IL-12	TNF- α	IL-22
Edad	0,747	0,071	0,235	0,052	0,479	0,571	0,784	0,543	0,493	0,245	0,023
Estancia hospitalaria (días)	0,133	0,380	0,042	0,299	0,181	0,091	0,059	0,178	0,445	0,707	0,656
Duración Diarrea (días)	0,938	0,716	0,405	0,867	0,025	0,756	0,064	0,816	0,758	0,969	0,226
Nº deposiciones/día	0,525	0,000	0,007	0,009	0,492	0,424	0,313	0,054	0,023	0,992	0,557
Duración vómitos	0,818	0,791	0,947	0,189	0,194	0,529	0,889	0,953	0,677	0,382	0,027
Nº máx. vomitos/día	0,280	0,038	0,026	0,039	0,895	0,100	0,517	0,084	0,017	0,302	0,285
Temperatura	0,612	0,880	0,823	0,832	0,533	0,989	0,342	0,530	0,610	0,875	0,272
Nivel de Deshidratación	0,875	0,382	0,494	0,768	0,194	0,984	0,635	0,973	0,850	0,375	0,189
Score Vesikari	0,270	0,005	0,007	0,009	0,827	0,294	0,389	0,109	0,005	0,577	0,090

Tabla 11: Niveles de significación según el test de Spearman para la asociación de los niveles de citocinas obtenidos en fase aguda en SUERO con los parámetros clínicos de los pacientes infectados. Se muestra en negrita aquellos valores p significativos ($P < 0.005$)

Encontramos valores de citocinas en suero con asociaciones significativas con parámetros clínicos, destacando por su alto valor de significancia: IFN- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-12 y su asociación con el Score de gravedad de Vesikari ($r^2=0.606$, $r^2=0.582$, $r^2=0.571$ y $r^2=0.598$ respectivamente)

En el **Gráfico 16** se destacan estos valores que muestran una asociación clínica significativa ($P < 0.05$) mediante la prueba de Spearman:



5.2.4.3 Correlación de los valores de citocinas con la edad de los pacientes

Para descartar que las asociaciones encontradas no sean debido a la edad del paciente, se analizó mediante la prueba de Spearman si existía alguna asociación entre los valores de citocinas y la edad del paciente. En las tablas anteriores se analizó la asociación entre la edad en meses de los pacientes y los valores de citocinas encontrados tanto en suero y saliva.

Como se puede observar por los valores de significación calculados, tan solo la IL-22 en suero muestra una asociación con la edad de los pacientes ($r^2 = +0.519$)

$P=0.023$) Con esta citocina no se encontró ninguna asociación clínica significativa.

En el **Gráfico 17** se muestra la asociación de las citocinas EGF (saliva), IFN- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-12 (suero) con la edad de los pacientes:

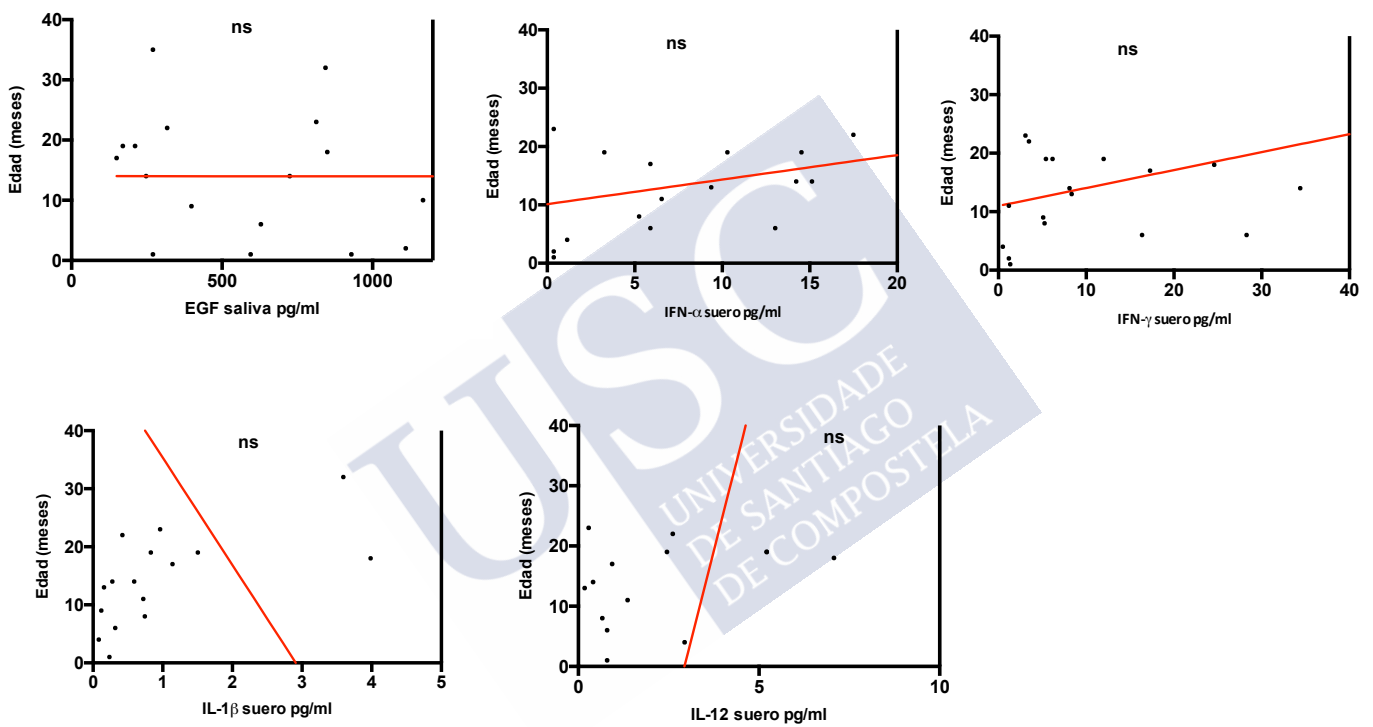


Gráfico 17: Asociación entre los valores de citocinas EGF (saliva), IFN- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-12 (suero) con la edad de los pacientes de la cohorte infectados

5.2.4.4 Correlación entre la respuesta mediada por citocinas en suero y saliva

Se analizó (Tablas 12 y 13) si existía alguna correlación entre los valores de citocinas obtenidos en suero y saliva para cada una de las cohortes mediante el calculo del coeficiente de correlación de Spearman. No se encontró ninguna asociación significativa.

SALIVA/SUERO	EGF	IFN- α	IFN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-15	IL-12	TNF- α	IL-22
EGF	0,906	0,476	0,718	0,909	0,814	0,442	0,322	0,151	0,228	0,473	0,616
IFN- α	0,291	0,635	0,801	0,855	0,711	0,868	0,404	0,757	0,807	0,829	0,034
IFN- γ	0,745	0,264	0,523	0,596	0,267	0,333	0,482	0,974	0,878	0,075	0,284
IL-1 β	0,436	0,376	0,936	0,676	0,670	0,361	0,681	0,168	0,533	0,391	0,587
IL-6	0,828	0,056	0,797	0,742	0,923	0,673	0,986	0,127	0,167	0,844	0,425
IL-8	0,676	0,360	0,530	0,491	0,468	0,204	0,668	0,057	0,110	0,190	0,887
IL-10	0,683	0,344	0,380	0,729	0,963	0,428	0,342	0,843	0,658	0,454	0,909
IL-15	0,596	0,109	0,751	0,797	0,571	0,424	0,509	0,549	0,858	0,094	0,478
IL-12	0,713	0,081	0,819	0,898	0,634	0,655	0,418	0,490	0,586	0,132	0,521
TNF- α	0,472	0,386	0,586	0,983	0,909	0,909	0,753	0,151	0,580	0,960	0,604
IL-22	0,523	0,571	0,901	0,951	0,857	0,549	0,220	0,392	0,057	0,078	0,182

Tabla 12: Niveles de significación según el test de Spearman para la asociación entre los valores de citocinas en suero y saliva en la cohorte de pacientes INFECTADOS.

SALIVA/SUERO	EGF	IFN- α	IFN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-15	IL-12	TNF- α	IL-22
EGF	0,304	0,779	0,271	0,779	0,364	0,383	0,105	0,294	0,779	0,271	0,019
IFN- α	0,185	0,219	0,346	0,219	0,142	0,964	0,929	0,224	0,219	0,346	0,543
IFN- γ	0,565	0,287	0,045	0,287	0,951	0,059	0,119	0,064	0,287	0,045	0,143
IL-1 β	0,394	0,442	0,836	0,442	0,971	0,262	0,346	0,880	0,442	0,836	0,227
IL-6	0,128	0,086	0,586	0,086	0,709	0,217	0,041	0,361	0,086	0,586	0,258
IL-8	0,905	0,415	0,719	0,415	0,242	0,763	0,243	0,685	0,415	0,719	0,158
IL-10	0,234	0,589	0,113	0,589	0,806	0,353	0,864	0,116	0,589	0,113	0,538
IL-15	0,128	0,443	0,276	0,567	0,876	0,123	0,345	0,234	0,098	0,258	0,178
IL-12	0,627	0,376	0,552	0,376	0,878	0,845	0,131	0,755	0,376	0,552	0,212
TNF- α	0,941	0,064	0,133	0,056	0,886	0,057	0,131	0,064	0,133	0,123	0,451
IL-22	0,128	0,086	0,089	0,341	0,132	0,051	0,361	0,579	0,258	0,125	0,098

Tabla 13: Niveles de significación según el test de Spearman para la asociación entre los valores de citocinas en suero y saliva en la cohorte de pacientes VACUNADOS.

5.3 Análisis de la respuesta inmune celular a diferentes antígenos de rotavirus en ambas cohortes

Empleamos el método de estimulación en sangre completa (*WBS, whole blood stimulation assay*) para evaluar la respuesta inmune celular diferencialmente en la cohorte de pacientes vacunados e infectados. La respuesta celular fue evaluada en respuesta a dos antígenos de rotavirus: cepa de rotavirus humano salvaje (Wa-1) y cepa de rotavirus vacunal (cepa RIX4414, obtenida a partir de vacuna monovalente)

5.3.1 Respuesta inmune celular a antígenos de rotavirus en la cohorte de pacientes infectados

La respuesta inmune celular medida a través del perfil de citocinas liberados fue evaluada en la cohorte de pacientes infectados, durante la Fase Aguda de la infección, al no haber conseguido muestra de sangre en el período de convalecencia. Los valores obtenidos tras la estimulación se resumen en la Tabla 14:

Parámetro	Fase Aguda (n=16)			
	Basal	wildRV	vacRV	PHA
IFN-α	2,98 (1,65 – 6,82)	11,40 (7,32-38,76)	16,03 (7,29-37,07)	44,74 (31,04-62,57)
IFN-γ	1,67 (0,88-3,11)	1,80 (1,04-8,62)	3,14 (1,19-85,44)	144,9 (129-239,7)
IL-1β	8,05 (1,86-13,67)	8,81 (1,91-36,13)	77,91 (9,00-1139)	948 (139-1575)
IL-6	18,05 (11,59-65,39)	137,8 (14,03-982,7)	1480 (149,9-2456)	1803 (549-3465)
IL-8	167 (124-317,3)	2021 (487,2-2720)	2779 (1562-2978)	4545 (2617-7458)
IL-10	2,98 (1,65-6,82)	23,82 (4,21-64,83)	36,52 (6,01-582,4)	92,50 (36,25-341,3)
IL-15	0,82 (0,33-1,22)	1,16 (0,0-2,33)	0,35 (0,0-1,21)	12,87 (11,00-23,00)
IL-12	0,0 (0,0-0,68)	0,0 (0,0-0,1)	0,70 (0,0-3,35)	135 (58,0-317,3)
TNF-α	2,98 (1,65-6,82)	26,30 (4,48-145,9)	50,63 (9,54-289,0)	167,5 (136,0-348)

wildRV = cepa rotavirus humana salvaje (Wa-1)

vacRV = cepa rotavirus vacuna RIX4414

PHA = control positivo (Fitohemaglutinina)

Basal = control negativo (Medio de cultivo)

Tabla 14: Valores (pg/ml) de citocinas obtenidos tras la estimulación de sangre completa obtenida en Fase Aguda de pacientes de la cohorte infectados. Se representan los datos como Mediana (Rango intercuartílico)

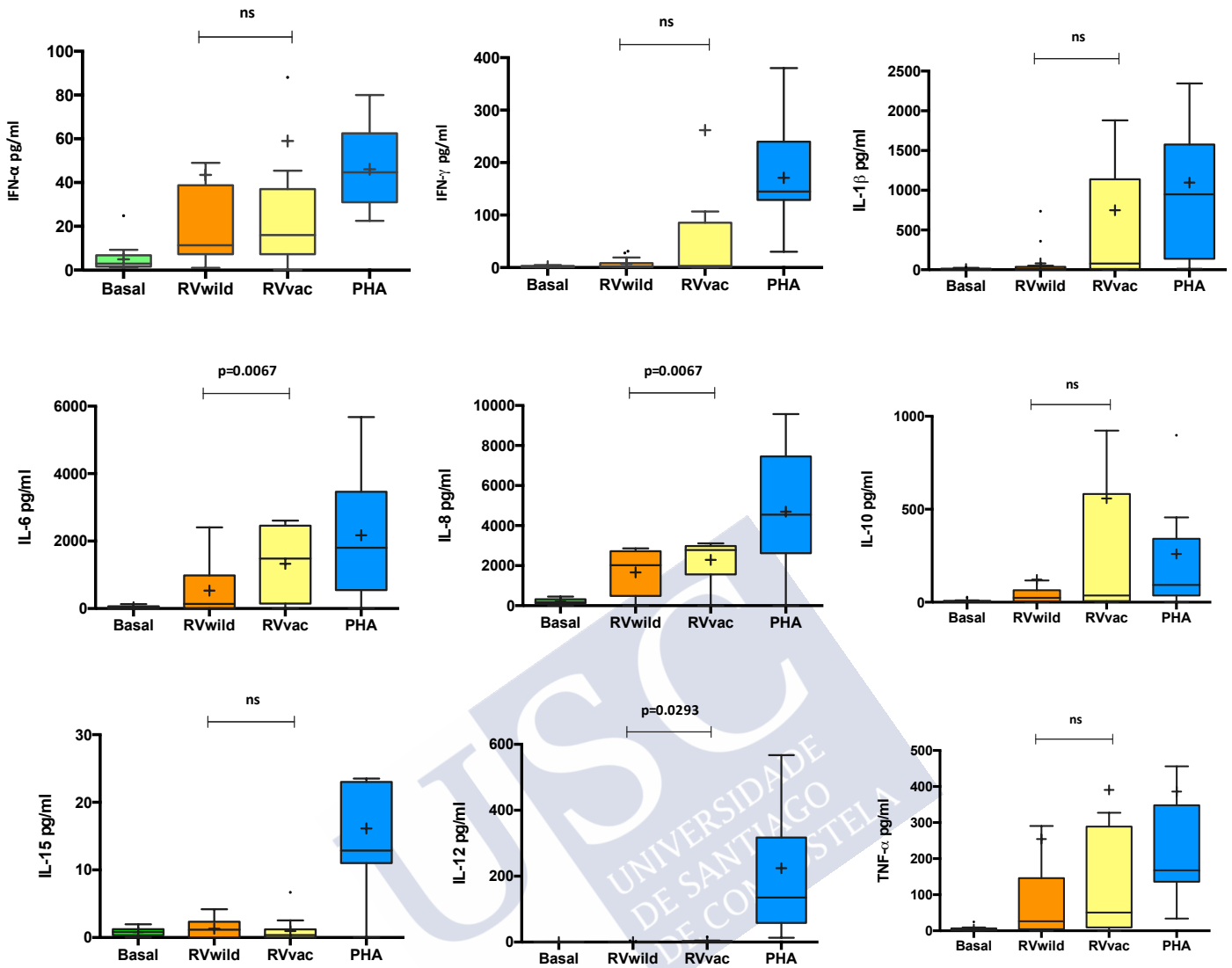


Gráfico 18: Producción de citocinas (pg/ml) evaluadas mediante análisis multiplex en respuesta a antígeno salvaje de rotavirus (RV_{wild}) y antígeno vacunal rotavirus (RV_{vac}) en sangre completa de paciente infectado en Fase Aguda. Se representa el control negativo para determinar los niveles basales y el control positivo con PHA. Se representa la mediana de los valores y el rango intercuartílico. El test de Wilcoxon realizado muestra las diferencias entre los dos antígenos de rotavirus empleados.

ns = no significativo PHA = Fitohemaglutinina

El Gráfico 18 muestra la representación de los valores donde se observa una potente respuesta inmune celular durante la fase aguda de la infección, con producción de IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 IL-15 y TNF- α en respuesta a antígenos del rotavirus. En la representación gráfica de los valores se observan, además, las diferencias entre los dos antígenos de rotavirus empleados. Como

se puede observar, principalmente IL-6 e IL-8, mostraron diferencias significativas entre ambos antígenos, con mayores niveles obtenidos con el antígeno vacunal que el antígeno salvaje. En el resto de citocinas medidas no se observaron diferencias significativas.

5.3.2 Respuesta inmune celular a antígenos de rotavirus en la cohorte de pacientes vacunados

De igual modo que en la cohorte de pacientes infectados, se evaluó el perfil de citocinas liberadas en respuesta a dos antígenos diferentes de rotavirus en muestras obtenidas en Pre-Dosis 1 y Post-Dosis 3. Los valores se resumen en la Tabla 15:

Parámetro	Pre-Dosis 1 (n=59)			
	Basal	wildRV	vacRV	PHA
IFN- α	2,99 (1,96-9,10)	59,70 (26,23-136,2)	71,16 (25,69-114,6)	221 (135,3-325,5)
IFN- γ	3,39 (1,97-12,0)	3,76 (1,66-7,87)	3,43 (1,31-8,73)	148,8 (133,5-278,3)
IL-1 β	2,99 (1,96-9,10)	77,81 (25,65-222,6)	77,67 (34,29-246,6)	157,9 (134,6-323,5)
IL-6	134 (112,3-189)	477,6 (235,1-1189)	512,2 (159,5-1433)	465,7 (233,1-1087)
IL-8	345 (112-818,3)	2801 (1902-3258)	2644 (1683-3226)	2572 (1716-3437)
IL-10	2,99 (1,96-9,10)	17,12 (8,44-33,68)	16,84 (9,89-41,55)	20,31 (9,84-36,51)
IL-15	0,43 (0,10-0,76)	0,52 (0,10-0,82)	0,40 (0,07-0,88)	8,01 (5,18-10,76)
IL-12	0,0 (0,0-0,48)	0,0 (0,0-0,51)	0,0 (0,0-1,11)	18,27 (10,03-29,90)
TNF- α	0,0 (0,0-11,0)	51,22 (29,92-137,3)	56,80 (37,21-129,4)	300,0 (191,2-487,1)

Parámetro	Post-Dosis 3 (n=56)			
	Basal	wildRV	vacRV	PHA
IFN- α	2,79 (1,96-9,10)	58,69 (16,45-246,9)	40,40 (18,83-158,3)	211 (135,3-325,5)
IFN- γ	3,11 (0,237-9,7)	3,23 (1,41-7,01)	3,28 (1,87-6,65)	148,8 (133,5-278,3)
IL-1 β	2,63 (1,45-9,72)	46,13 (10,77-88,42)	40,53 (8,35-158,5)	147,6 (234,1-303,2)
IL-6	130,7 (98,4-197,4)	229,4 (22,23-881,6)	224,0 (20,08-1191)	477,6 (235,1-1189)
IL-8	319,7 (109,7-809,3)	2347 (1335-2836)	2293 (490,9-2577)	2237 (1799-3356)
IL-10	2,78 (1,77-9,34)	10,68 (6,06-27,15)	13,54 (4,94-26,80)	19,87 (10,03-37,45)
IL-15	0,67 (0,39-1,96)	5,96 (3,08-7,65)	5,56 (2,26-6,88)	7,76 (5,34-10,38)
IL-12	0,0 (0,0-0,48)	0,09 (0,0-1,38)	0,04 (0,0 - 1,30)	19,35 (9,45-27,89)
TNF- α	0,04 (0,0-11,0)	29,41 (13,81-62,78)	28,30 (11,21-85,11)	279 (178-456)

wildRV = cepa rotavirus humana salvaje (Wa-1)
 vacRV = cepa rotavirus vacuna RIX4414
 PHA = control positivo (Fitohemaglutinina)
 Basal = control negativo (Medio de cultivo)

Tabla 15: Valores (pg/ml) de citocinas obtenidos tras la estimulación de sangre completa obtenida en Pre-Dosis 1 y Post-Dosis 3 de la cohorte de pacientes vacunados. Se representan los datos como Mediana (Rango intercuartílico)

Se representan a continuación los valores de citocinas obtenidos en respuesta a ambos antígenos en la muestra Pre-Dosis 1 (Gráfico 19) y Post-Dosis 3 (Gráfico 20):

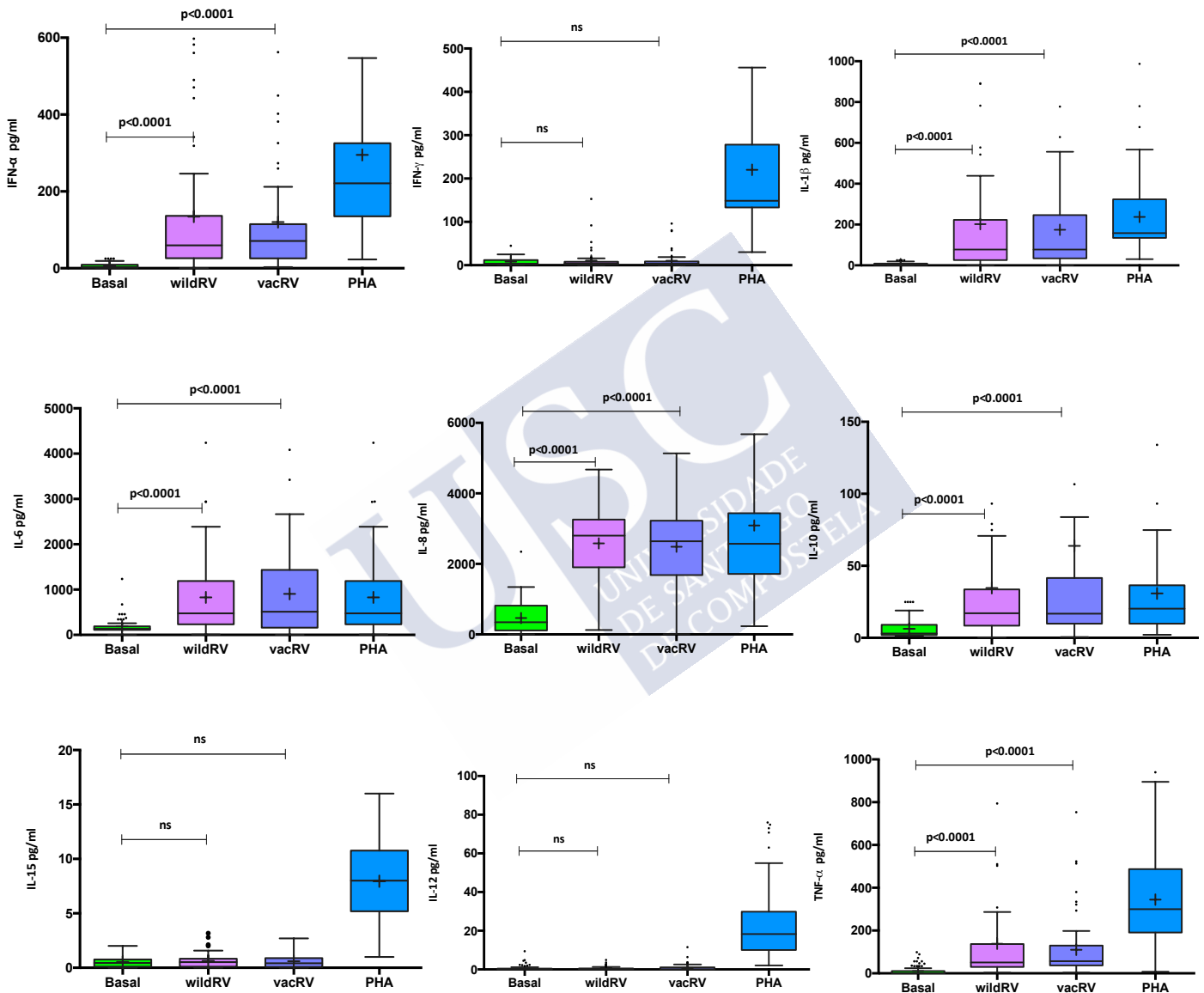


Gráfico 19: Producción de citocinas (pg/ml) evaluadas mediante análisis multiplex en respuesta a diferentes antígenos de rotavirus en la muestra tomada ANTES de la vacunación (Pre-Dosis 1). Se representa el control negativo para determinar los niveles basales y el control positivo con PHA. Se representa la mediana de los valores y el rango intercuartílico. El test de Wilcoxon realizado muestra las diferencias entre ambas muestras pre y post-vacunación.

ns = no significativo PHA = Fitohemaglutinina

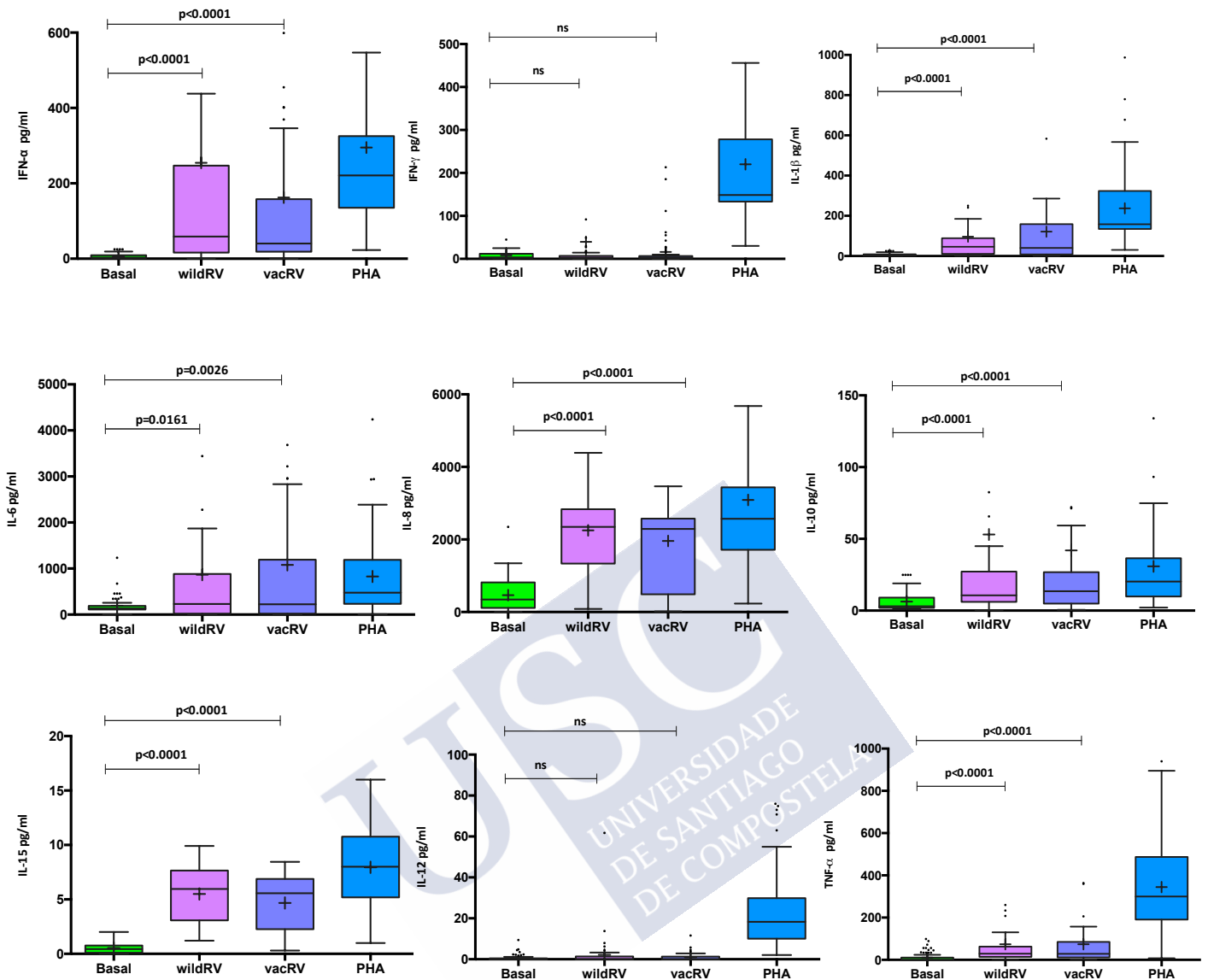


Gráfico 20: Producción de citocinas (pg/ml) evaluadas mediante análisis multiplex en respuesta a diferentes antígenos de rotavirus en la muestra tomada DESPUES de la vacunación (Post-Dosis 3). Se representa el control negativo para determinar los niveles basales y el control positivo con PHA. Se representa la mediana de los valores y el rango intercuartílico. El test de Wilcoxon realizado muestra las diferencias entre ambas muestras pre y post-vacunación.

ns = no significativo PHA = Fitohemaglutinina

Se observa que el perfil de citocinas es similar salvo por la producción de IL-15 en las muestras post-vacunación. En las muestras obtenidas previo a la vacunación no se produce síntesis de IL-15 en respuesta a ninguno de los

antígenos de rotavirus, mientras que tras la vacunación si se produce la síntesis de IL-15.

En los Gráficos 21 y 22 se representa comparativamente los valores correspondientes a la muestra Pre-Dosis 1 y Post-Dosis 3 para cada uno de los antígenos diferentes de rotavirus empleados:

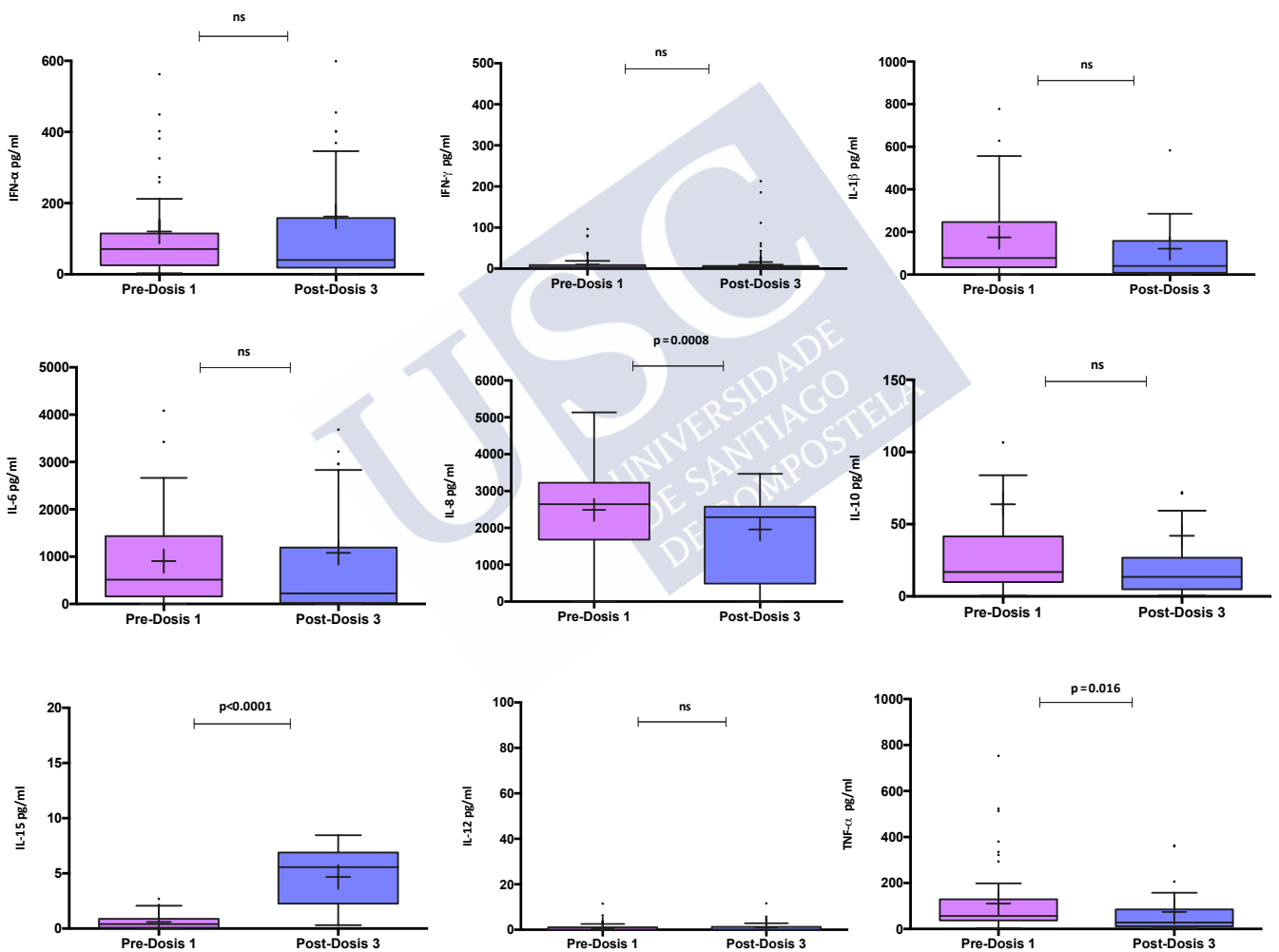


Gráfico 21: Producción de citocinas (pg/ml) evaluadas mediante análisis multiplex en respuesta a antígeno vacunal rotavirus (RV_{vac}) en sangre completa de paciente vacunado en muestra Pre-Dosis 1 y Post-Dosis 3. Se representa la mediana de los valores y el rango intercuartílico. El test de Wilcoxon realizado muestra las diferencias entre ambas muestras pre y post-vacunación.

ns = no significativo

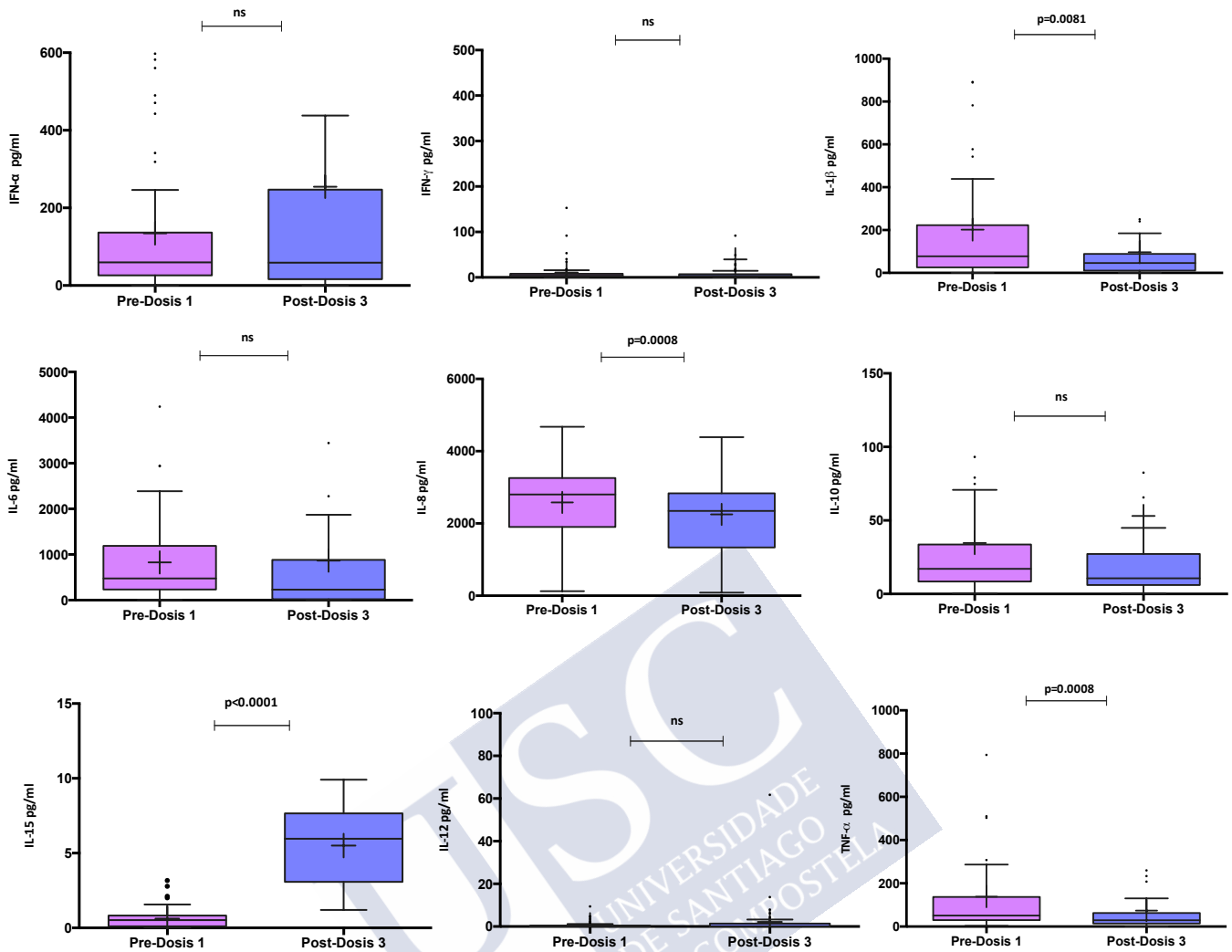


Gráfico 22: Producción de citocinas (pg/ml) evaluadas mediante análisis multiplex en respuesta a antígeno salvaje rotavirus (RV_{wild}) en sangre completa de paciente vacunado en muestra Pre-Dosis 1 y Post-Dosis 3. Se representa la mediana de los valores y el rango intercuartílico. El test de Wilcoxon realizado muestra las diferencias entre ambas muestras pre y post-vacunación.

ns = no significativo

Como se puede observar, en la cohorte de pacientes vacunados, varias citocinas muestran cambios significativos en su producción tras la vacunación. Estas citocinas son: IL-1 β (significativa solo tras estimulación con antígeno salvaje de rotavirus), IL-8, IL-15 y TNF- α (significativas con ambos antígenos de rotavirus). En el caso de IL-1 β , IL-8 y TNF- α se produce un descenso en su producción tras

la vacunación, mientras que en el caso de la IL-15, aumenta su producción tras la vacunación.

En el Gráfico 23 se muestra el estudio comparativo de la respuesta a los diferentes antígenos de rotavirus en la cohorte de pacientes vacunados:

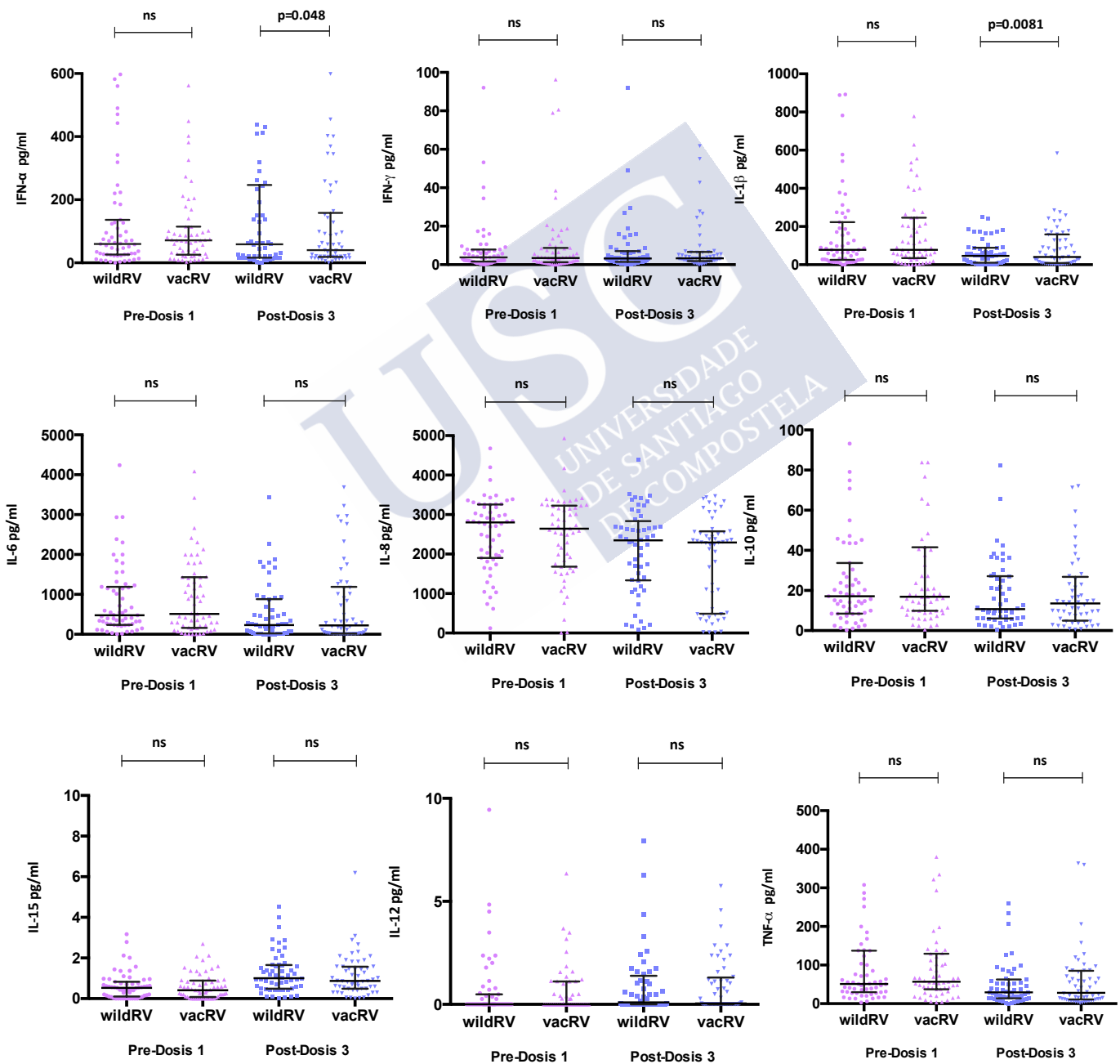


Gráfico 23: Estudio comparativo de los valores (pg/ml) de citocinas en respuesta a dos antígenos diferentes de rotavirus, salvaje (RV_{wild}) y vacunal (RV_{vac}) en sangre completa de paciente vacunado antes de la toma de la vacuna (Pre-Dosis 1) y tras la vacunación (Post-Dosis 3) Se representa la mediana de los valores y el rango intercuartílico. El test de Wilcoxon realizado muestra las diferencias en la respuesta a ambos antígenos de rotavirus.

En el caso de la cohorte de pacientes vacunados, se observan diferencias mínimamente significativas en la producción de citocinas en respuesta a los dos antígenos de rotavirus al nivel de IFN- α e IL-1 β , pero tan solo en la muestra obtenida tras la vacunación (Post-Dosis 3) En este caso, a diferencia de la cohorte de pacientes infectados, se obtienen valores ligeramente superiores de citocinas en la estimulación con el antígeno salvaje de rotavirus.

5.3.3 Comparación de la respuesta inmune celular obtenida entre la cohorte de pacientes infectados y vacunados

En el Gráfico 24 se muestra el estudio comparativo en la respuesta de citocinas entre ambas cohortes, comparando los valores de citocinas obtenidos en Fase Aguda (Cohorte Infectados) y tomando la muestra Pre-Dosis 1 (Cohorte Vacunados) como muestra control.

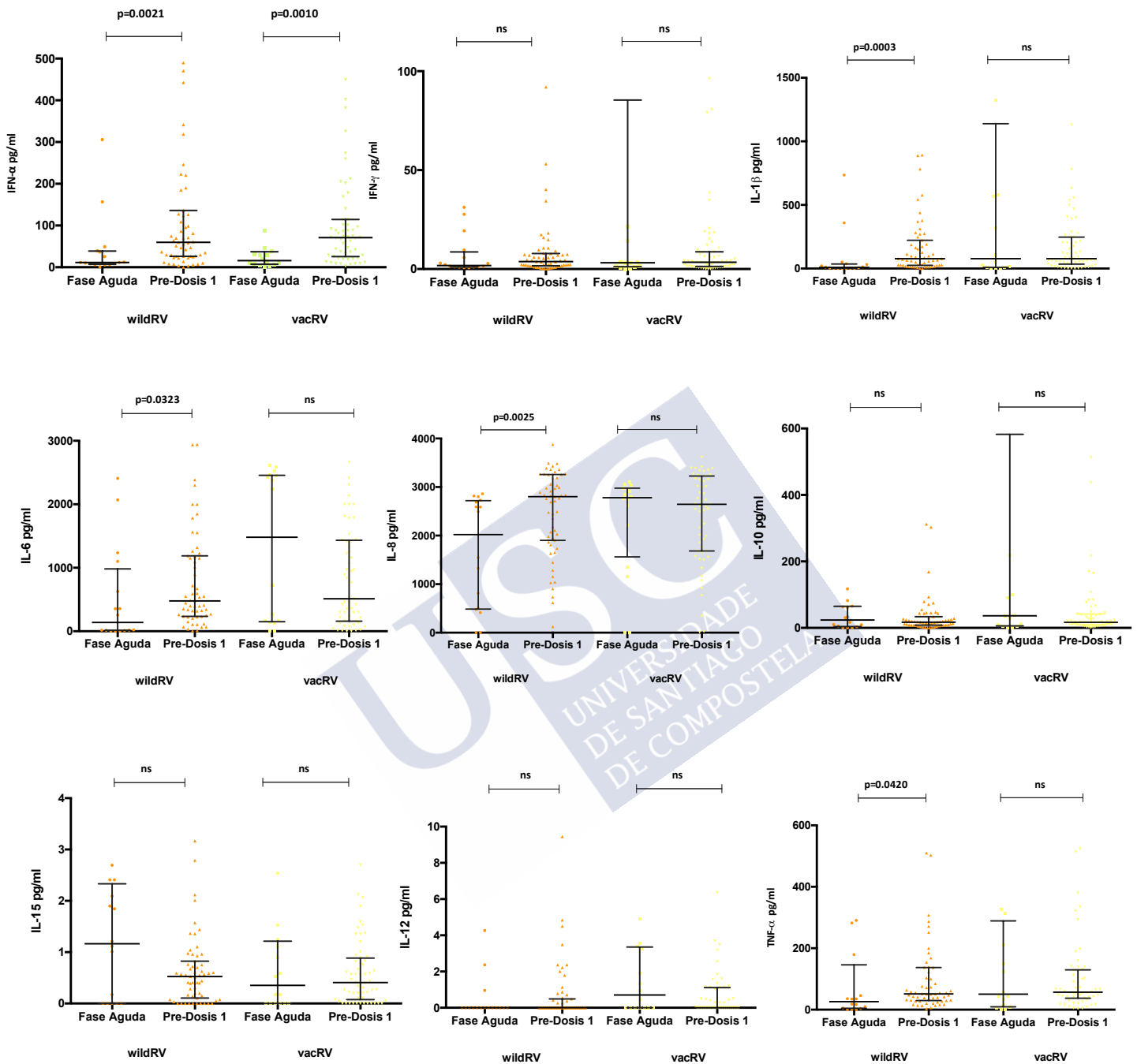


Gráfico 24: Comparación en los valores de citocinas (pg/ml) obtenidos entre la cohorte de pacientes infectados (Fase Aguda) y la muestra Pre-Dosis 1 (Vacunados) tomada como muestra control, en respuesta a antígeno de rotavirus salvaje (wildRV) y vacunal (vacRV). Se representa la mediana de los valores y el rango intercuartílico. El test de Wilcoxon realizado muestra las diferencias en la respuesta entre ambas cohortes.

Como se puede observar en la imagen, varias citocinas presentan diferencias en su producción entre ambas muestras: IFN- α (con ambos antígenos de rotavirus), IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α (solo en respuesta al antígeno salvaje de rotavirus) En todos los casos, el nivel de estas citocinas es inferior en la muestra tomada en fase aguda de la infección con respecto a la muestra control.

5.3.4 Correlación de la respuesta inmune celular con el curso clínico en la cohorte de pacientes infectados

Se estudió la correlación existente entre la respuesta inmune celular durante la fase aguda de la infección y el curso clínico de los pacientes infectados mediante el análisis de Pearson.

En la Tabla 16 siguiente se presentan los valores de significancia del valor de cada citocina con la estancia hospitalaria y el Score de Gravedad de Vesikari:

<i>Correlación Pearson valores p</i>	IFN- α	IFN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-15	IL-12	TNF- α
Estancia Hospitalaria	0.874	0.848	0.050	0.102	0.340	0.028	0.562	0.435	0.119
Score Vesikari	0.156	0.417	0.002	0.019	0.013	0.227	0.934	0.116	0.207
Edad	0,116	0,745	0,123	0,223	0,113	0,353	0,823	0,441	0,652
<i>Correlación Pearson valor coeficiente</i>	IFN- α	IFN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-15	IL-12	TNF- α
Estancia Hospitalaria	-0.043	+0.052	+0.497	+0.424	+0.255	+0.549	+0.172	+0.210	+0.481
Score Vesikari	-0.372	+0.218	-0.704	-0.578	-0.606	-0.320	-0.008	+0.592	-0.333
Edad	-0.422	-0.158	-0.540	-0.283	-0.425	-0.548	-0.063	+0.461	-0.126

Tabla 16: Asociaciones mediante correlación de Pearson entre los valores de citocinas y el Score de Gravedad de Vesikari. Se representa el valor p obtenido (parte superior) y el valor del coeficiente (parte inferior)

Encontramos por lo tanto una asociación positiva de los valores de **IL-10** con la Estancia Hospitalaria ($P=0.028$, $r^2=+0.549$) lo que indica que, a mayor producción de esta citocina en respuesta al rotavirus, mayor será el tiempo de recuperación y de estancia hospitalaria.

Por otro lado, hay varias citocinas que se asocian con el Score de gravedad de Vesikari: **IL-1 β** ($P=0.002$, $r^2=-0.704$), **IL-6** ($P=0.019$, $r^2=-0.578$) e **IL-8** ($P=0.013$, $r^2=-0.606$) muestran una asociación negativa con el valor del score de gravedad. Esto indica que a mayor capacidad de producción de las citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 por parte del paciente infectado en respuesta al rotavirus, menor puntuación alcanza en la escala de gravedad.

Para descartar que estas asociaciones no estuviesen relacionadas con la edad del paciente se correlacionaron los valores de citocinas con la edad, no obteniéndose en ningún caso asociación significativa alguna entre la edad del paciente y la capacidad de producción de citocinas en respuesta a los antígenos de rotavirus.

5.3.5 Correlación entre la inmunidad celular y la inmunidad humoral en la cohorte de pacientes vacunados

Para analizar si existía alguna asociación entre el título de IgA específicos frente a rotavirus y la respuesta inmune celular del paciente, seleccionamos aquellos pacientes de la cohorte vacunados de los que tuviésemos datos de inmunidad humoral e inmunidad celular.

En un subgrupo de 26 pacientes vacunados establecimos una correlación entre los valores de citocinas producidos en respuesta al antígeno salvaje de rotavirus tras la vacunación (Post-Dosis 3) y el título de anticuerpos IgA frente a rotavirus en suero alcanzado tras la vacunación.

En la Tabla 17 se muestran los valores de significación para las diferentes asociaciones entre los niveles de citocinas y el título de anticuerpos:

<i>Correlación Pearson valores p</i>	IFN- α	IFN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-15	IL-12	TNF- α
RV-IgA post-dosis 3 (Suero)	0,2165	0,3932	0,2450	0,2943	0,3892	0,3921	0,0310	0,2850	0,0023
<i>Correlación Pearson valor coeficiente</i>	IFN- α	IFN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-15	IL-12	TNF- α
RV-IgA post-dosis 3 (Suero)	0,2458	0,1712	0,2364	0,2095	-0,1762	0,1752	0,4237	0,2178	0,5713

Tabla 17: Asociaciones mediante correlación de Pearson entre los valores de citocinas y el título de Anticuerpos RV-IgA en suero obtenidos en Post-Dosis 3. Se representa el valor p obtenido (parte superior) y el valor del coeficiente (parte inferior)

Como se puede observar, encontramos una asociación positiva entre la producción de **IL-15** y **TNF- α** con los valores alcanzados de anticuerpos IgA en suero frente a rotavirus, en la cohorte de pacientes vacunados, datos representados en el **Gráfico 25**. En la cohorte infectados no se pudo realizar el

estudio de asociación al no haber podido completar datos de un mínimo razonable de pacientes.

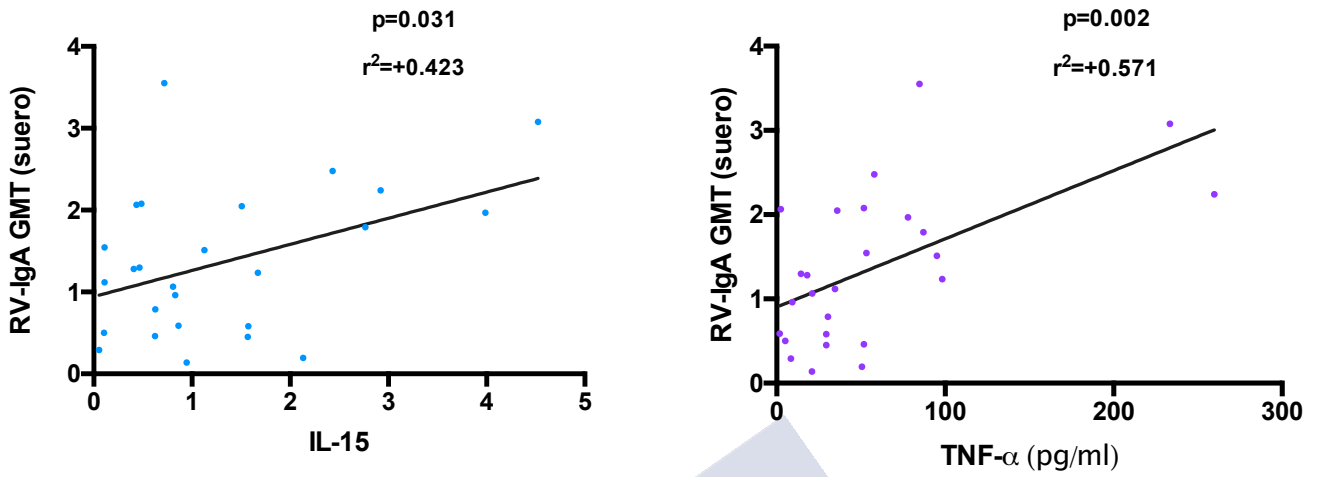
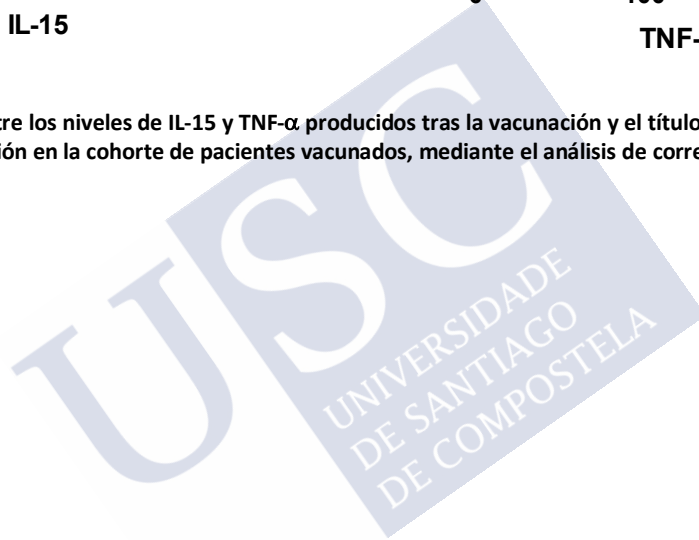


Gráfico 25: Asociación entre los niveles de IL-15 y TNF- α producidos tras la vacunación y el título de Anticuerpos frente a rotavirus alcanzado tras la vacunación en la cohorte de pacientes vacunados, mediante el análisis de correlación de Pearson.



5.4 Estudio comparativo de los perfiles moleculares de inmunización humoral en el suero tras la infección natural y tras la vacunación

Se realizó el estudio comparativo de los perfiles moleculares de inmunización humoral generados tras la infección natural y tras la vacunación, con el objetivo de analizar diferencias.

Para ello se realizó un pool representativo de muestras de suero de cada cohorte (infectados vs vacunados) y se enfrentó a un lisado de proteínas de rotavirus (cepa Wa-1) separadas mediante electroforesis bidimensional y transferidas a una membrana de PVDF (*Inmunoblotting*)

En el Gráfico 26 se muestran los diferentes perfiles de inmunización obtenidos:



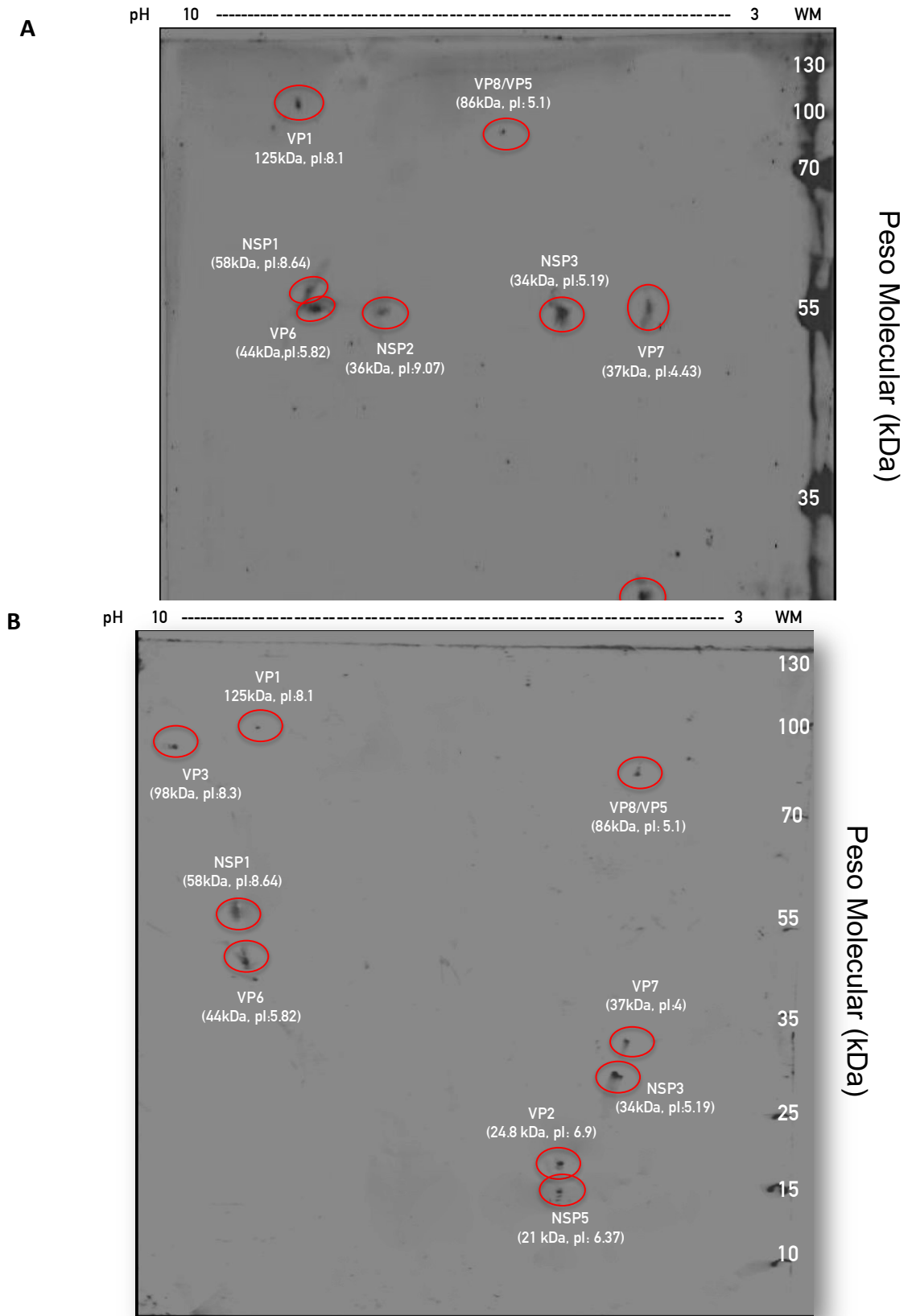
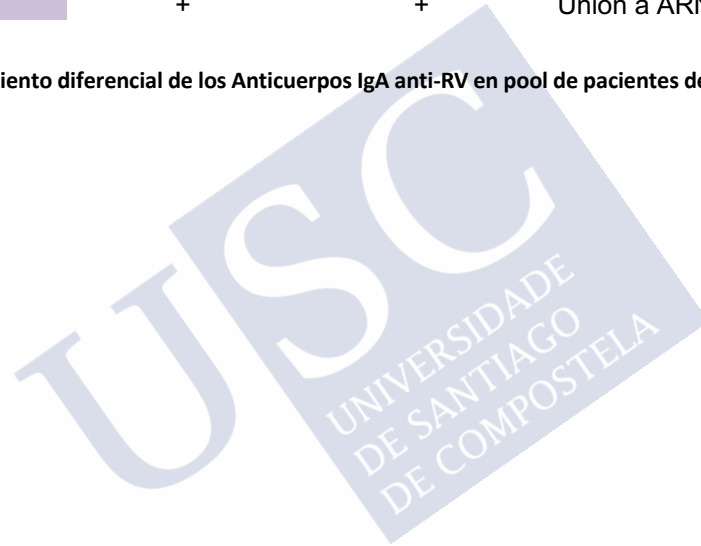


Gráfico 26: Perfiles moleculares de inmunización en suero obtenidos en pool de muestras de A) pacientes infectados en fase de convalecencia y B) pacientes vacunados tras la toma de la tercera dosis (Post-Dosis 3)

En la Tabla 18 se relacionan las proteínas virales reconocidas en ambas cohortes de pacientes:

Proteínas Rotavirus	Pool Infectados	Pool Vacunados	Función/Localización
VP1	+	+	ARN polimerasa / Core
VP2	-	+	Unión a ARN / Core
VP3	-	+	ARN Transferasa / Core
VP4 (VP5+VP8)	+	+	Anclaje / Superficie
VP6	+	+	Estructural / Cápside interna
VP7	+	+	Anclaje / Superficie
NSP1	+	+	Unión a ARN / No estructural
NSP2	+	-	Unión a ARN / No estructural
NSP3	+	+	Unión a ARN / No estructural
NSP4	-	-	Enterotoxina / No estructural
NSP5	+	+	Unión a ARN / No estructural

Tabla 18: Reconocimiento diferencial de los Anticuerpos IgA anti-RV en pool de pacientes de la cohorte infectados y vacunados.



5.5 Análisis del transcriptoma en el paciente infectado y vacunado

Mediante secuenciación de ARN (ARN-seq) se procedió a cuantificar la expresión directa de todos los genes presentes en la sangre de los pacientes infectados y vacunados.

5.5.1 Análisis del transcriptoma en el paciente infectado vs grupo control

5.5.1.1 *Características clínicas de pacientes infectados y grupo control*

Todos los niños reclutados para este sub-estudio (rango de edad 1,9-14,4 meses, *ratio* masculino/femenino = 8,3) tenían el calendario de inmunización de rutina al día y ninguno había recibido la vacuna de rotavirus o había sufrido infecciones de rotavirus previas en el momento de la toma de muestras. Los pacientes empleados para grupo control pertenecían a la cohorte de paciente vacunados en el momento previo a la vacunación (Pre-dosis 1). En el grupo de pacientes infectados, el tiempo medio entre el ingreso hospitalario y la toma de muestras fue de tres días. Todos los pacientes infectados mostraron una recuperación completa después de una estancia media hospitalaria de 4 días (desviación estándar = 2,3 días)

Las características clínicas de las muestras analizadas para el estudio del transcriptoma se recogen en la Tabla 19:

Id Muestra	Grupo	Sexo	Premat	Caract clínicas relevantes	Estancia Hospitalaria (días)	Fiebre	Score Vesikari	Score Clínico
GLO_41	Control	Masc	No		-	-	-	-
GLO_13	Control	Masc	No		-	-	-	-
GLO_17	Control	Femen	No	Sepsis al nacimiento	-	-	-	-
GLO_66	Control	Masc	No		-	-	-	-
GLO_76	Control	Femen	No		-	-	-	-
GLO_81	Control	Masc	No		-	-	-	-
GLO_84	Control	Femen	No		-	-	-	-
GLO_85	Control	Masc	No		-	-	-	-
GLO_86	Control	Femen	No		-	-	-	-
GLO_91	Control	Femen	No	Reflujo, sepsis al nacimiento	-	-	-	-
GLO_94	Control	Femen	No		-	-	-	-
GLO_98	Control	Masc	No		-	-	-	-
GLO_99	Control	Masc	No		-	-	-	-
GLO_2	Infectado	Femen	No	Fallo de crecimiento desde 6 meses edad	4	Si	10	Moderado
GLO_4	Infectado	Femen	No		4	Si	11	Moderado
GLO_5	Infectado	Femen	No	Diestrés respiratorio perinatal	1	No	11	Moderado
GLO_6	Infectado	Femen	No	Hiperbilirubinemia e ictericia	3	Si	12	Moderado
GLO_100	Infectado	Femen	Si (28sem)	Prematuridad, diestrés respiratorio y apneas	5	Si	15	Grave

Tabla 19: Características clínicas de las muestras analizadas para el estudio del transcriptoma. Todos los pacientes y controles fueron recogidos en Galicia y pertenecían al mismo ancestro europeo.

5.5.1.2 Análisis de componentes principales (PCA) en ambos grupos de muestras

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el objetivo de visualizar el patrón de transcriptoma global de los datos obtenidos mediante ARN-seq en el grupo de infectados y control. Este análisis PCA permite inspeccionar los patrones diferenciales de expresión entre las muestras, así como la identificación de los posibles *outliers* y facilitar la decisión con respecto al análisis basado en clústeres de muestras.

El análisis de componentes principales (PCA) de ambos grupos de muestras se representa en el Gráfico 27:

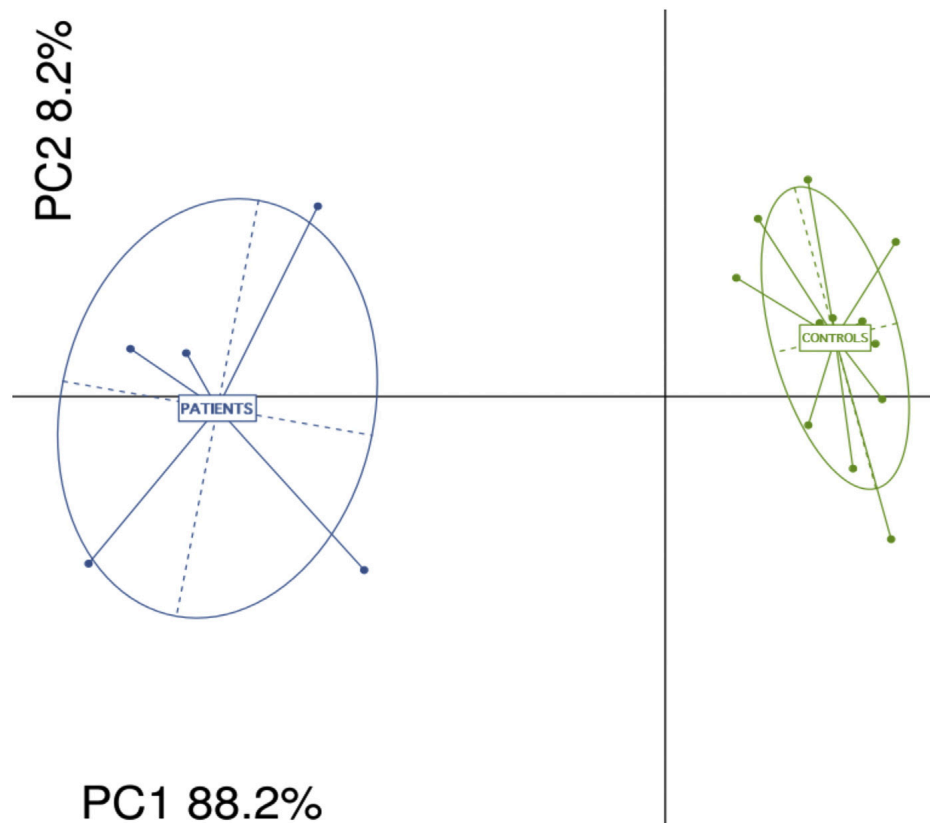


Gráfico 27: Análisis de los componentes principales (PCA) de patrones de expresión del transcriptoma en el grupo de pacientes infectados y grupo control.

El análisis PCA del transcriptoma global identificó un *outlier* (#GLO_3) Analizando las características clínicas de este paciente reveló que había desarrollado un curso leve de la enfermedad comparado con los otros pacientes infectados. Además, la muestra de sangre había sido obtenida en el primer día de ingreso hospitalario. Posteriormente, este paciente desarrolló una infección nosocomial durante el 4º día de ingreso debido a una infección respiratoria. El resto de los pacientes solo desarrollaron una infección por rotavirus exclusivamente y los síntomas se desarrollaron desde los dos días previos hasta los siete días de ingreso hospitalario. La muestra de este paciente fue retirada del análisis final para no interferir con los resultados.

El análisis final de PCA se muestra en el Gráfico 23 donde se puede observar dos clústeres principales que corresponden a los dos grupos bien diferenciados (control e infectados). Por tanto, en el análisis de datos de secuenciación de ARN se incluyeron finalmente 13 individuos control y 5 pacientes del grupo infectados.

5.5.1.3 Resultados de la secuenciación de ARN (ARN-sec)

El análisis de datos obtenidos a partir de la secuenciación del ARN de las muestras de ambos grupos mostró la existencia de transcritos que se correspondían a la expresión de **19.865 genes** autosómicos. Mediante la herramienta GO (*Gene Ontology*) se identificaron **19.426 genes**, por tanto 619 genes no pudieron ser identificados.

La comparación de la expresión génica entre el grupo de individuos control y el grupo de pacientes infectados indicó que había **474 genes** que mostraban una expresión diferencial estadísticamente significativa; esta expresión diferencial explica los clústeres obtenidos mediante análisis PCA. La gran mayoría de estos genes (**n=445**) pudo ser identificado y corresponden a genes con función conocida. Los 29 genes restantes no pudieron ser identificados y mostraban una función desconocida. Sin embargo, 11 de estos 29 genes poseen al menos un dominio asociado a inmunoglobulina, y todos ellos se mostraron activados en el grupo infectados.

En el **Gráfico 28** se muestra el patrón de transcripción observado para las diferentes muestras analizadas:

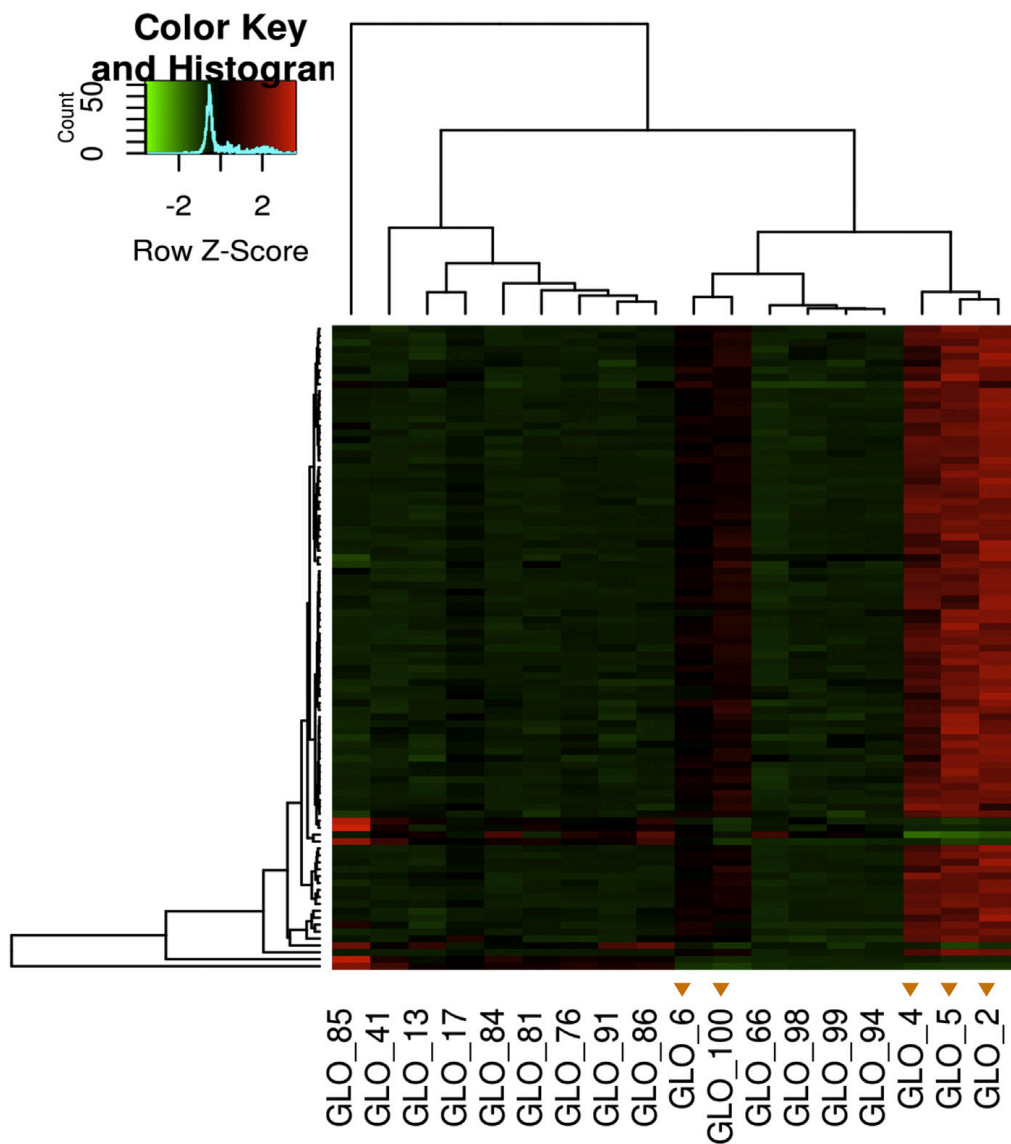


Gráfico 28: Mapa de calor mostrando los incrementos en los patrones de expresión génica diferencial analizados en cada una de las muestras de pacientes e individuos control. En la leyenda de la imagen (arriba a la izquierda) se indica la cantidad de genes que muestra los correspondientes valores de incremento en la expresión.

Los patrones de transcripción observados en los diferentes pacientes infectados mostraron ser muy homogéneos con relación a su número y genes *up-* y *down-* regulados, como se puede apreciar en la imagen.

El análisis de la función global de los genes implicados empleando la herramienta GO mostraba que en el grupo de pacientes infectados había una sobreexpresión de genes del ciclo celular de forma muy significativa (P -valor = 10^{-40}) como se puede observar en el **Gráfico 29**:

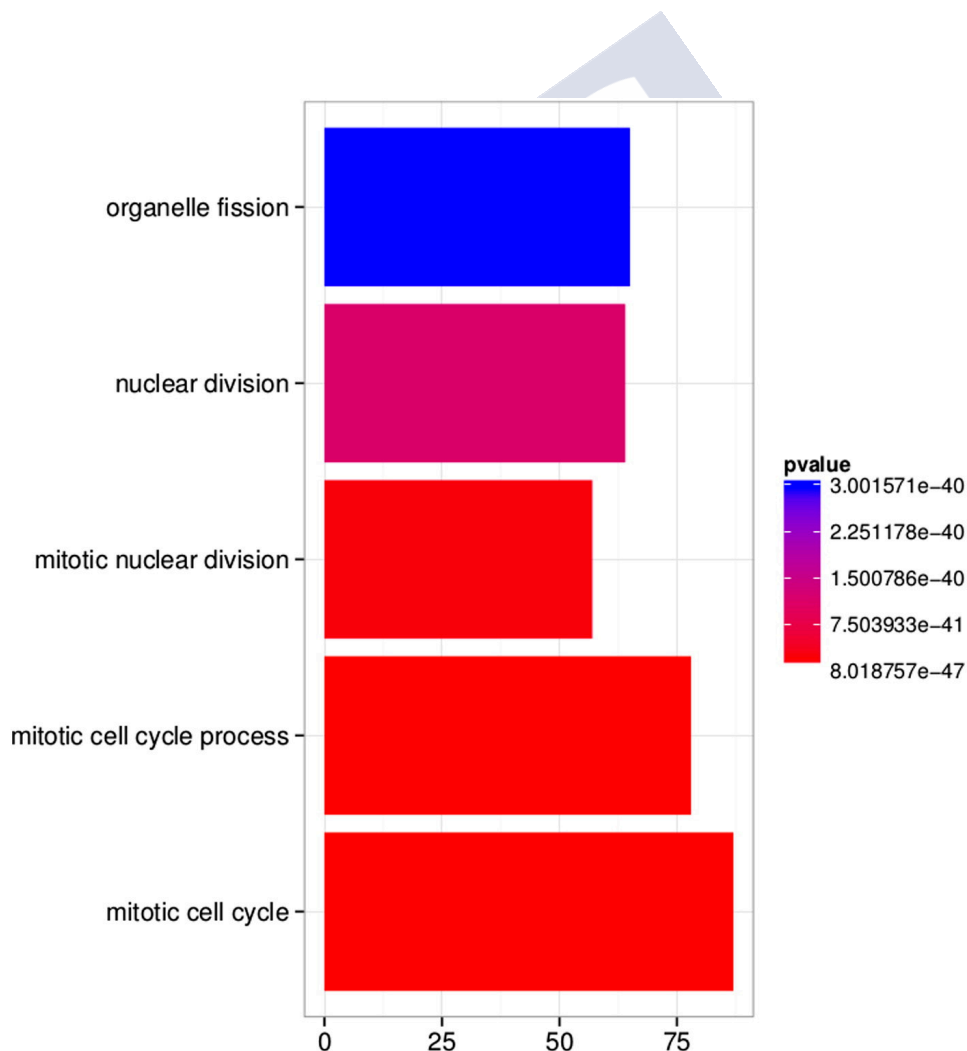


Gráfico 29: Análisis funcional de enriquecimiento de conjunto de genes en pacientes infectados frente al grupo control mediante la herramienta GO muestra que los genes pertenecientes a la categoría del ciclo celular son los genes más diferencialmente expresados entre ambos grupos de muestras. En el eje-X se muestra el número de genes diferencialmente expresados asociados con las distintas categorías funcionales.

La comparación de los genes diferencialmente expresados (por activación y por inhibición) en el grupo de pacientes infectados y el grupo control empleando la anotación funcional de las vías KEGG mostraban también que las **proteínas del ciclo celular** se encontraban globalmente sobreexpresadas, y afectaban a un total de 80 de 111 genes (72%) como se puede observar en el **Gráfico 30**:

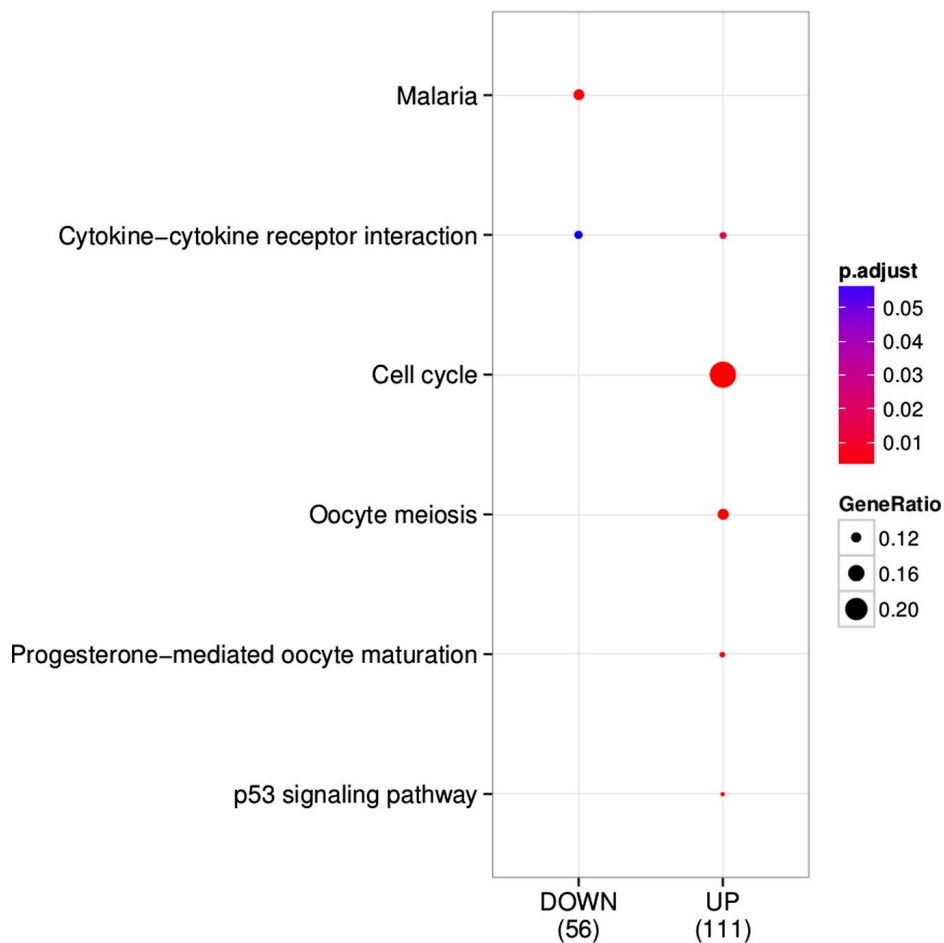


Gráfico 30: Categorías funcionales de expresión génica diferencial según el análisis de vías KEGG. Dentro de la categoría Up y Down se incluyen genes sobreexpresados/infraexpresados considerados estadísticamente significativos. GeneRatio es el cociente entre el número de genes de cada categoría dividido por todos los genes específicos en el grupo.

Los datos analizados indican una clara activación de los **factores de transcripción E2F** en las muestras de pacientes infectados: E2F1 ($\Delta=2,2$), E2F2 ($\Delta=2,3$) y E2F8 ($\Delta=5$). Usando diferentes fuentes biológicas y metodología de redes se identificó que estos factores de transcripción regulan varios aspectos del ciclo celular a través de la modulación de la expresión de diferentes complejos de reconocimiento de origen (ORCs) y controlando el ciclo mitótico, como se puede observar en el **Gráfico 31**:

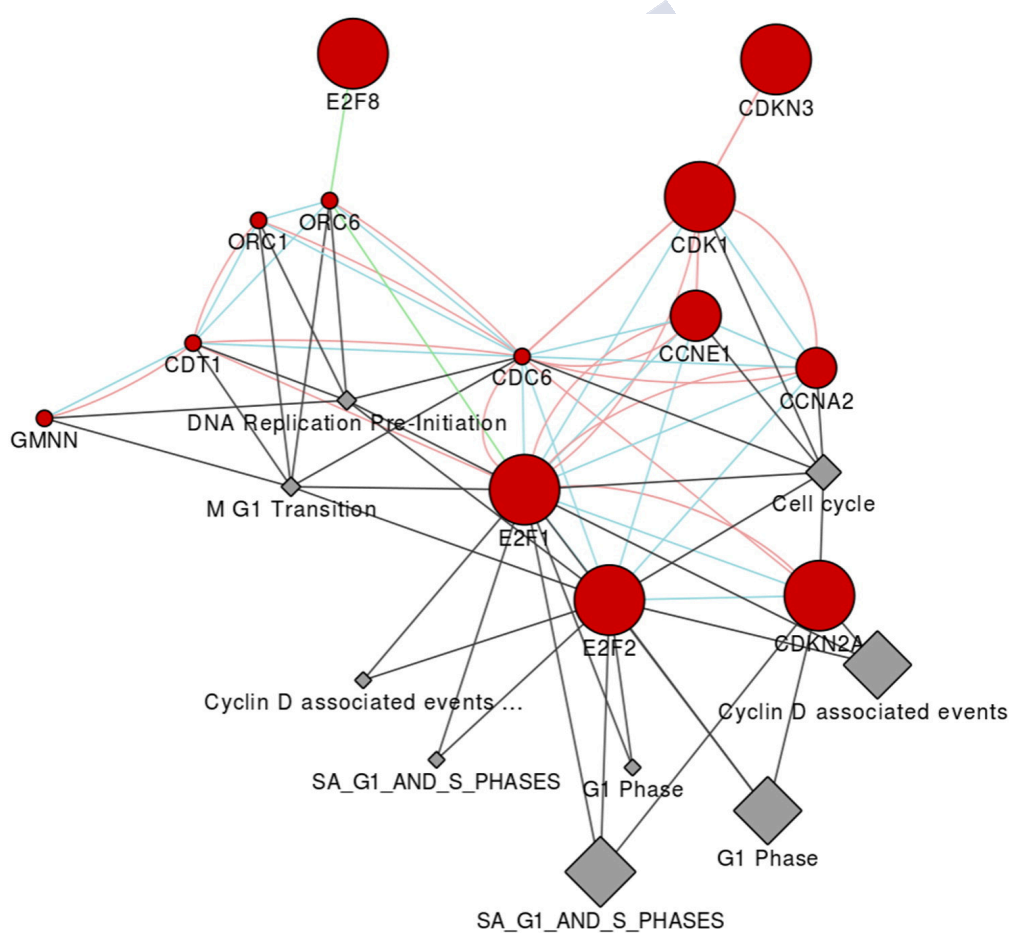


Gráfico 31: Análisis de redes de los factores de transcripción E2F indicando el complejo escenario de interacciones relacionadas con el ciclo celular. El color rojo indica la situación de genes activados.

Por otro lado, los datos indican que dos categorías de genes relacionados con respuesta inmune como son los genes de respuesta a **Malaria** y las interacciones **Citocina-Receptor de Citocina**, se encuentran claramente inhibida en los pacientes con respecto al grupo control.

De los genes de ambas categorías, relacionados con respuesta inmune, destaca el gen para la **proteína 27 inducible por IFN- α (IFI27)** que muestra el valor de incremento mayor de todos los genes diferencialmente expresados en el grupo de pacientes con respecto al grupo control ($\Delta=23,8$, valor $P=0.0014$). Otro gen con activación moderada en el grupo de pacientes fue el gen para **interleucina-12 (IL-12)** ($\Delta=3,5$, valor $P=0.013$).

Entre los genes con mayor inhibición encontrados en nuestros datos destacan el gen para la **hemoglobina γ 1 (HBG1)** ($\Delta= -77$, valor $P=0.0016$), el gen para la **proteína de unión a Selenio 1 (SELENBP1)** ($\Delta= -41$, valor $P=0.001$) y el gen para el **grupo sanguíneo Diego (SLC4A1)** ($\Delta= -27$, valor $P=0.001$).

De entre la serie de genes encontrados con inhibición en su expresión, destacan además tres de los cuatro genes para glicoforina detectados mediante secuenciación del ARN: los genes para las **glicoforinas A (GYPA)** ($\Delta= -7,5$, valor $P=0.0037$), **glicoforina B (GYPB)** ($\Delta= -20$, valor $P=0.0025$) y **glicoforina C (GYPC)** ($\Delta= -2,3$, valor $P=0.0014$)

El análisis de las redes de interacción de los diferentes genes para la glicoforina (Gráfico 32) muestra relación con otros genes relacionados con el metabolismo del hematíe como son: proteína estabilizadora hemoglobina- α (**AHSP**), anhidrasa carbónica 1 (**CA1**), anhidrasa carbónica 4 (**CA4**), proteína transportadora aniónica Banda-3 (**SLC4A1**) y el enzima mitocondrial delta aminolevulinato sintasa 2 (**ALAS2**), todos ellos con expresión inhibida durante la infección por rotavirus.

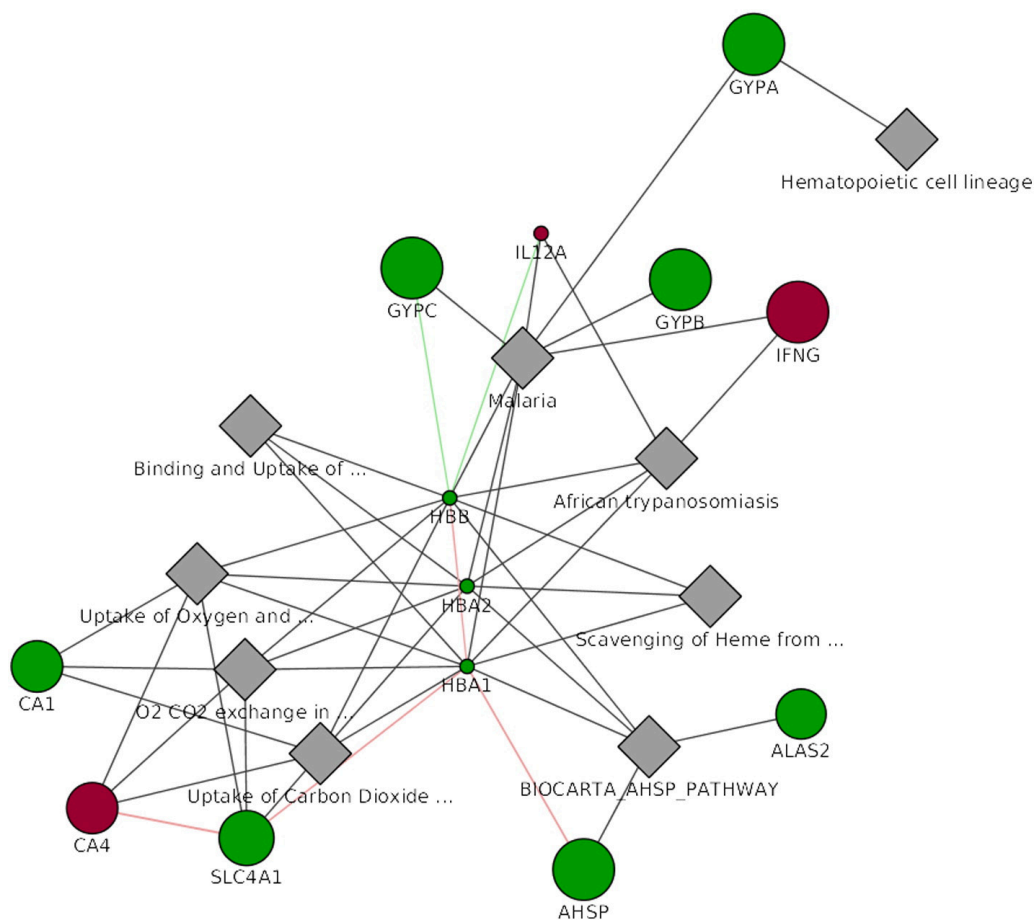


Gráfico 32: Análisis de redes de los genes para la glicoforina GYPA/B/C y sus interacciones con otros genes relacionados con el hematíe. El color rojo y verde indica respectivamente la situación de genes activados e inhibidos.

La expresión de los genes en el grupo de pacientes infectados mostraba además una alta correlación (Pearson $r = 0.8$) como se muestra en el **Gráfico 33**, lo que es compatible con una regulación directa de estos genes sobre el ciclo celular.

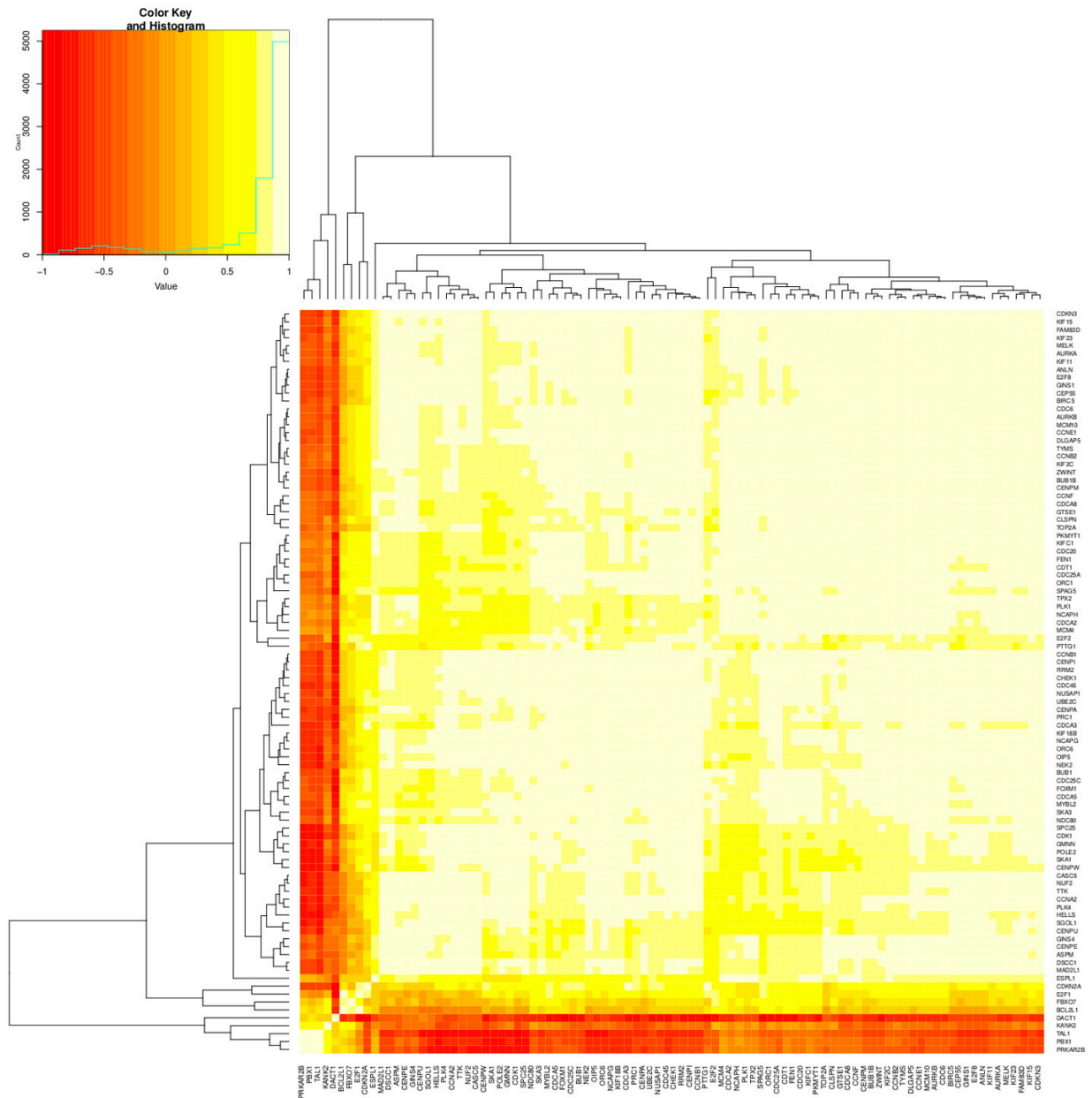


Gráfico 33: Mapa de calor que muestra los patrones de correlación entre genes diferencialmente expresados en los pacientes infectados. La función de densidad (línea verde) en la leyenda de la imagen (arriba izquierda) indicaba la cantidad de genes que muestra el correspondiente valor de correlación.

5.5.1.4 *Análisis transcriptómico de los genes de respuesta inmunitaria frente al rotavirus*

Centrando el análisis transcriptómico en los genes relacionados directamente con la respuesta inmunitaria, obtenemos un total de 75 genes diferencialmente inhibidos/activados que nos dan una idea de como es la respuesta inmune generada durante la infección por rotavirus. En la **Tabla 20** se relacionan los genes que se encuentran diferencialmente inhibidos y activados, así como su función conocida.



Tabla 20: Expresión diferencial de genes relacionados con respuesta inmunitaria en pacientes vs control mostrando la función de los genes

Ensembl_ID	Nombre Gen	Cromosoma	Δ	P-valor ajustado	Función del Gen
ENSG00000123838	<i>C4BPA</i>	chr1	-11.428	0.00585665	Inhibe la acción del complemento
ENSG00000162722	<i>TRIM58</i>	chr1	-9.562	0.00142852	Regulación negativa expresión TLR2
ENSG00000169245	<i>CXCL10</i>	chr4	-5.704	0.01307760	Quimioatrayente células T, NK, dendríticas
ENSG00000091181	<i>IL5RA</i>	chr3	-3.930	0.00142852	Receptor para IL-5
ENSG00000090920	<i>FCGBP</i>	chr19	-3.331	0.00142852	Proteína de unión a Fc IgG
ENSG00000105366	<i>SIGLEC8</i>	chr19	-3.252	0.00142852	Receptor inhibidor membrana eosinófilos
ENSG00000158488	<i>CD1E</i>	chr1	-2.763	0.01055640	Presentación de antígenos lipídicos a células T
ENSG00000179639	<i>FCER1A</i>	chr1	-2.624	0.00142852	Receptor alta afinidad Fc IgE
ENSG00000163735	<i>CXCL5</i>	chr4	-2.619	0.00689309	Quimiotaxis y activación de neutrófilos
ENSG00000232629	<i>HLA-DQB2</i>	chr6	-2.465	0.03197730	Presentación antigénica
ENSG00000237541	<i>HLA-DQA2</i>	chr6	-2.089	0.00142852	Presentación antigénica
ENSG00000196083	<i>IL1RAP</i>	chr3	-2.022	0.00142852	Proteína accesoria del receptor IL-1
ENSG00000172183	<i>ISG20</i>	chr15	2.034	0.00142852	Actividad antiviral frente a virus ARN
ENSG00000137441	<i>FGFBP2</i>	chr4	2.044	0.00142852	Proteína con actividad citotóxica
ENSG00000176083	<i>ZNF683</i>	chr1	2.045	0.00689309	Diferenciación células NK
ENSG00000163464	<i>CXCR1</i>	chr2	2.058	0.00142852	Receptor para IL-8, activación neutrófilos
ENSG00000198933	<i>TBKBP1</i>	chr17	2.060	0.01554680	Supervivencia células NK
ENSG00000008516	<i>MMP25</i>	chr16	2.089	0.00142852	Metaloproteinasa secretada por células NK
ENSG00000137265	<i>IRF4</i>	chr6	2.164	0.00142852	Factor regulador del interferon
ENSG00000196549	<i>MME</i>	chr3	2.170	0.00142852	CD10, enzima metaloproteinasa
ENSG00000004468	<i>CD38</i>	chr4	2.173	0.00142852	Marcador de activación celular en linfocitos
ENSG00000119632	<i>IFI27L2</i>	chr14	2.196	0.00142852	Actividad pro-apoptótica
ENSG00000105374	<i>NKG7</i>	chr19	2.205	0.00142852	Enzima proteolítica liberada por células NK
ENSG00000181036	<i>FCRL6</i>	chr1	2.251	0.00373316	Marcador diferenciación linfocitos citotóxicos
ENSG00000077984	<i>CST7</i>	chr20	2.329	0.00142852	Regulación células NK y células T
ENSG00000115523	<i>GNLY</i>	chr2	2.339	0.00142852	Enzima citotóxica de células NK y CD8
ENSG00000160791	<i>CCR5</i>	chr3	2.340	0.00142852	Receptor quimiocinas células T
ENSG00000137757	<i>CASP5</i>	chr11	2.348	0.03572250	Caspasa con actividad inflamatoria
ENSG00000124256	<i>ZBP1</i>	chr20	2.371	0.00263678	Sensor de ARN viral de inmunidad innata
ENSG00000105501	<i>SIGLEC5</i>	chr19	2.459	0.00263678	Molécula adhesión células fagocíticas
ENSG00000057657	<i>PRDM1</i>	chr6	2.469	0.00142852	Represor IFN- β , proliferación cel plasmáticas
ENSG00000142089	<i>IFITM3</i>	chr11	2.487	0.03388020	Efector antiviral sistema inmune innato
ENSG00000100453	<i>GZMB</i>	chr14	2.513	0.00142852	Granzima B expresado por células citotóxicas
ENSG00000026751	<i>SLAMF7</i>	chr1	2.517	0.00142852	Regulación células NK, marcador cel plasmát
ENSG00000161570	<i>CCL5</i>	chr17	2.533	0.00142852	RANTES, quimiotaxis leucocitos
ENSG00000205020	<i>CCL4L1</i>	chr17	2.662	0.03637160	Citocina inflamatoria
ENSG00000111537	<i>IFNG</i>	chr12	2.754	0.02401320	Interferon- γ , activación fagocitosis
ENSG00000183508	<i>FAM46C</i>	chr1	2.797	0.00142852	Proteína de respuesta a IFN-I
ENSG00000160932	<i>LY6E</i>	chr8	2.971	0.00142852	Proteína antiviral
ENSG00000163568	<i>AIM2</i>	chr1	2.995	0.00263678	Proteína del inflamasoma
ENSG00000100290	<i>BIK</i>	chr22	3.272	0.00142852	Proteína antiviral
ENSG00000112299	<i>VNN1</i>	chr6	3.293	0.00142852	Enzima panteteinasa secretada por células NK
ENSG00000188389	<i>PDCD1</i>	chr2	3.319	0.00142852	Proteína de muerte celular
ENSG00000100450	<i>GZMH</i>	chr14	3.401	0.00142852	Granzima H secretada por células citotóxicas
ENSG00000173585	<i>CCR9</i>	chr3	3.410	0.00142852	Receptor quimiocina linfocitos
ENSG00000168811	<i>IL12A</i>	chr3	3.479	0.01307760	Subunidad α IL-12
ENSG00000173372	<i>C1QA</i>	chr1	3.499	0.00142852	Subunidad A componente c1q
ENSG00000165948	<i>IFI27L1</i>	chr14	3.674	0.00142852	Respuesta a interferón, pro-apoptótica
ENSG00000137965	<i>IFI44</i>	chr1	4.140	0.00142852	Proteína de respuesta a interferón
ENSG00000123095	<i>BHLHE41</i>	chr12	4.249	0.00142852	Desarrollo de células B-1 ^a
ENSG00000137959	<i>IFI44L</i>	chr1	4.278	0.01467030	Respuesta a interferón, antiviral
ENSG00000123689	<i>GOS2</i>	chr1	4.417	0.00142852	Activación y diferenciación células T CD8+
ENSG00000173369	<i>C1QB</i>	chr1	4.532	0.00142852	Subunidad B componente c1q

Resultados

ENSG00000134285	FKBP11	chr12	4.821	0.01382790	Diferenciación células plasmáticas
ENSG00000182985	CADM1	chr11	5.439	0.00142852	Adhesión celular que media citotoxicidad NK
ENSG00000240505	TNFRSF13B	chr17	5.476	0.00142852	TACI, activación células B
ENSG00000117650	NEK2	chr1	5.595	0.00142852	Diferenciación células B
ENSG00000105974	CAV1	chr7	5.673	0.00142852	Caveolinas, inmunidad innata
ENSG00000100985	MMP9	chr20	5.712	0.00142852	Metaloproteinasa secretada por células NK
ENSG00000109956	B3GAT1	chr11	5.742	0.00142852	CD57, marcador células NK
ENSG00000089685	BIRC5	chr17	6.181	0.00142852	Desarrollo y activación células NK
ENSG00000165409	TSHR	chr14	6.695	0.03088750	Receptor TSH, activación células inmunes
ENSG00000189233	NUGGC	chr8	6.812	0.00142852	Formación centro germinal células B
ENSG00000089692	LAG3	chr12	7.067	0.00142852	Activación células T, B y NK
ENSG00000254709	IGLL5	chr22	7.269	0.00142852	Cadena ligera lambda inmunoglobulinas
ENSG00000048462	TNFRSF17	chr16	7.364	0.00142852	Activación células B
ENSG00000011590	ZBTB32	chr19	7.390	0.00142852	Proliferación células NK
ENSG00000125726	CD70	chr19	7.468	0.00373316	Marcador activación células T
ENSG00000170476	MZB1	chr5	9.009	0.00142852	Chaperona síntesis inmunoglobulinas
ENSG00000145850	TIMD4	chr5	9.230	0.00142852	Desarrollo respuestas Th2
ENSG00000204936	CD177	chr19	9.922	0.00142852	Activación y proliferación neutrófilos
ENSG00000115884	SDC1	chr2	10.731	0.00142852	Sindecano, proliferación de células inmunes
ENSG00000132465	IGJ	chr4	11.324	0.00142852	Cadena J, unión inmunoglobulinas
ENSG00000165949	IFI27	chr14	23.755	0.00142852	Respuesta a interferón, pro-apoptótica



5.5.2 Análisis del transcriptoma en el paciente vacunado vs grupo control

En el análisis del transcriptoma realizado sobre las muestras obtenidas tras la pauta completa de vacunación comparado con el grupo control previo a la vacunación no obtuvimos ninguna expresión diferencial significativa, lo cual era de esperar pues se corresponde con momentos de reposo inmunológico con lo cual la huella de expresión génica no difiere de la del grupo control.



5.6 Caracterización de la respuesta inmune celular tras la infección y tras la vacunación de rotavirus

Tras el ensayo de WBS se analizaron las células totales resultantes tras la estimulación con el antígeno de rotavirus salvaje (RV_{wild}) mediante citometría de flujo para el estudio del marcador de activación **CD69** en diferentes subpoblaciones celulares: T-CD4+, T-CD8+ y célula Natural Killer (NK) CD16+CD56+

5.6.1 Caracterización de la respuesta celular durante la fase aguda de la infección por rotavirus

Se estudiaron los cambios en las poblaciones linfocitarias y el análisis de la expresión del marcador de activación linfocitaria CD69+ tras el ensayo de estimulación con antígeno salvaje de rotavirus mediante WBS en los 16 pacientes reclutados durante la fase aguda de la infección por rotavirus. Los datos obtenidos se representan en la Tabla 21 y el Gráfico 34:

FASE AGUDA n=16	Células T-CD4		Células T-CD8		Células NK	
	%CD4+	%CD4+CD69+	%CD8+	%CD8+CD69+	%CD16+CD56+	%CD16+CD56+ CD69+
Basal	42,1 (37,9-46,4)	14,8 (13,8-17,0)	19,9 (18,7-23,2)	5,2 (2,6-6,6)	6,9 (4,8-10,3)	0,6 (0,3-1,1)
RV _{wild}	42,0 (39,4-46,8)	17,7 (15,6-19,3)	20,4 (19,5-26,6)	11,3 (8,1-13,1)	8,0 (5,6-10,2)	1,3 (0,9-1,7)
PHA	48,8 (47,5-51,3)	21,8 (20,4-25,3)	25,6 (23,4-27,0)	10,4 (9,3-11,3)	8,3 (6,7-10,1)	1,2 (1,0-1,5)

Tabla 21: Valores relativos de las diferentes poblaciones linfocitarias y la expresión de marcador de activación CD69 en pacientes infectados en fase aguda. Valores expresados en porcentajes de linfocitos totales: mediana (rango intercuartílico)

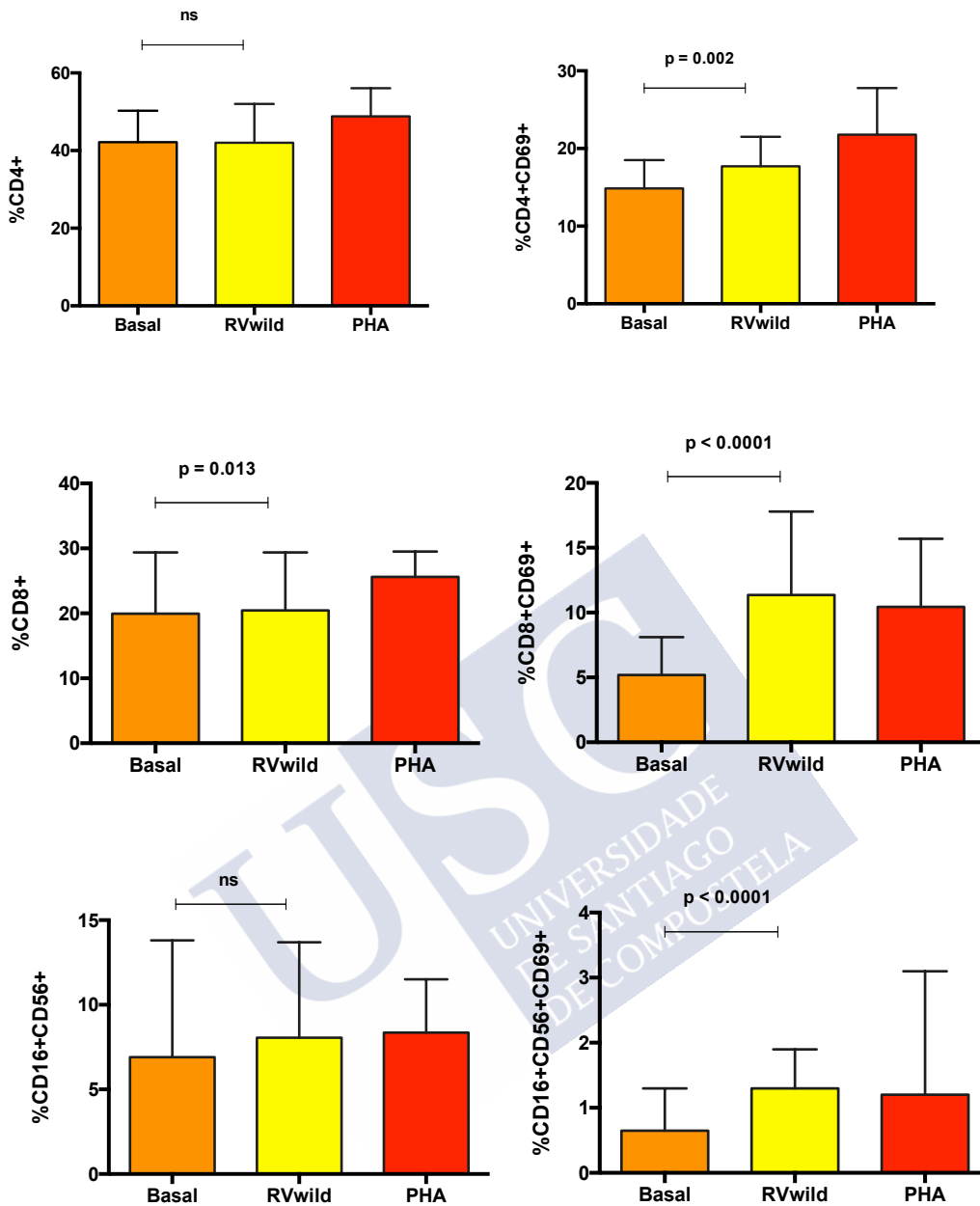


Gráfico 34: Distribución de las diferentes poblaciones linfocitarias (células T-CD4+, células T-CD8+ y células NK CD16+CD56+) y expresión del marcador de activación CD69 tras el ensayo WBS de estimulación con antígeno salvaje de rotavirus (RV_{wild}) en pacientes infectados en fase aguda. Se muestran las comparaciones realizadas mediante test de Wilcoxon (ns: no significativo) PHA: Fitohemaglutinina (control positivo)

5.6.2 Caracterización de la respuesta celular tras la vacunación frente al rotavirus

Se estudiaron los cambios en las poblaciones linfocitarias y el análisis de la expresión del marcador de activación linfocitaria CD69+ tras el ensayo de estimulación con antígeno salvaje de rotavirus mediante WBS en 16 pacientes vacunados frente a rotavirus, seleccionados al azar, tras completar la pauta completa de vacunación (**Post-Dosis 3**) Los datos obtenidos se representan en la Tabla 22 y el Gráfico 35:

POST-DOSIS 3 n=16	Células T-CD4		Células T-CD8		Células NK	
	%CD4+	%CD4+CD69+	%CD8+	%CD8+CD69+	%CD16+CD56+	%CD16+CD56+ CD69+
Basal	44,7 (40,1-50,2)	2,1 (1,6-3,6)	16,8 (15,3-19,3)	2,3 (1,7-3,0)	8,1 (6,9-11,0)	0,3 (0,2-0,6)
RV _{wild}	47,1 (40,7-50,1)	9,9 (7,8-12,5)	18,5 (16,7-22,1)	12,3 (10,0-15,1)	10,7 (8,7-12,3)	1,6 (1,4-1,8)
PHA	49,3 (47,5-55,3)	16,3 (14,7-17,6)	19,4 (17,7-24,0)	13,3 (11,9-16,4)	10,3 (9,4-11,5)	1,6 (1,2-2,4)

Tabla 22: Valores relativos de las diferentes poblaciones linfocitarias y la expresión de marcador de activación CD69 en pacientes tras vacunación completa frente a rotavirus (Post-Dosis 3). Valores expresados en porcentajes de linfocitos totales: mediana (rango intercuartílico)

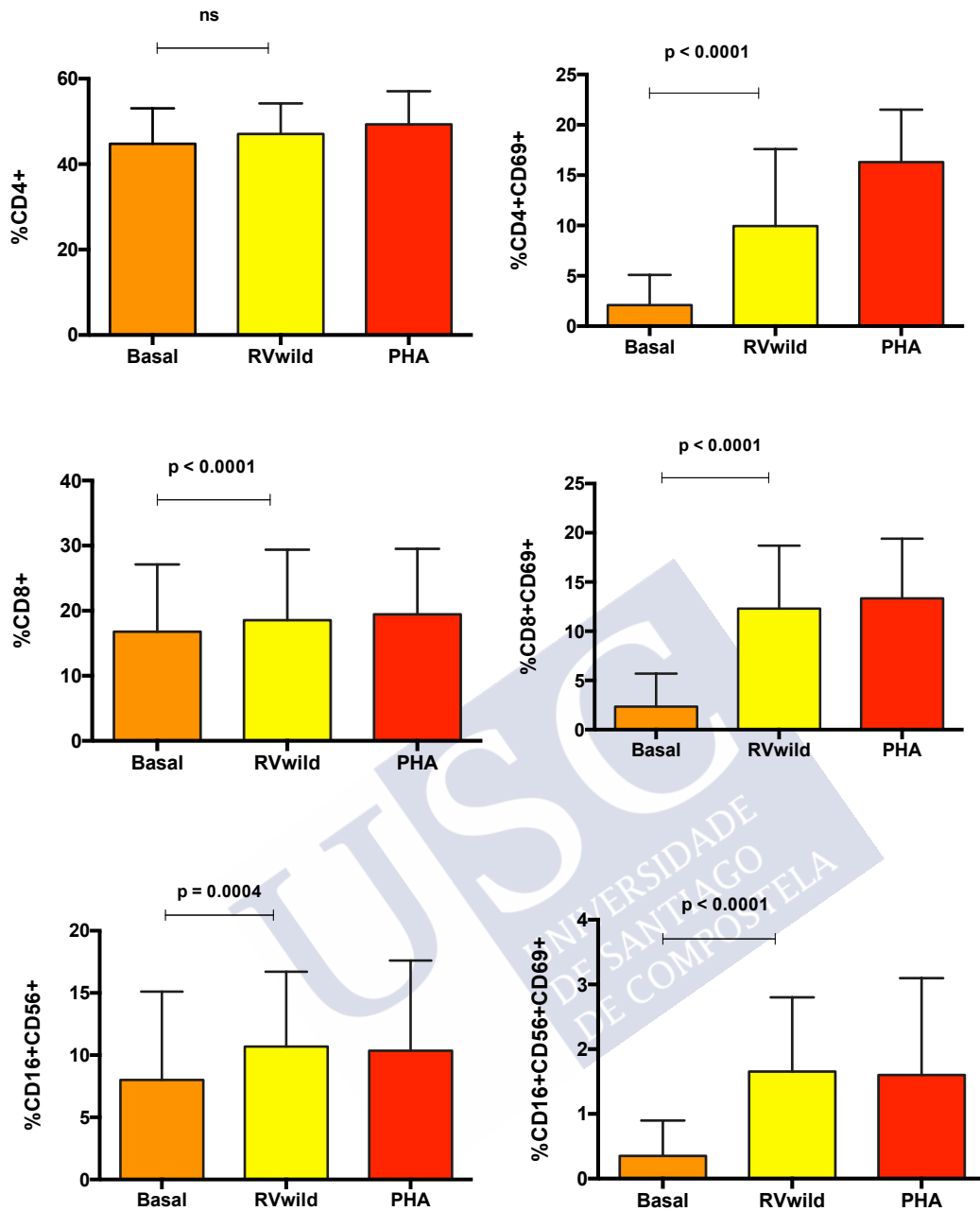


Gráfico 35: Distribución de las diferentes poblaciones linfocitarias (células T-CD4+, células T-CD8+ y células NK CD16+CD56+) y expresión del marcador de activación CD69 tras el ensayo WBS de estimulación con antígeno salvaje de rotavirus (RV_{wild}) en pacientes tras completar la vacunación con rotavirus (Post-Dosis 3) Se muestran las comparaciones realizadas mediante test de Wilcoxon (ns: no significativo)
 PHA: Fitohemaglutinina (control positivo)

6 DISCUSIÓN

6.1 Estudio de la respuesta humoral en la mucosa oral en respuesta a la infección natural y a la vacunación

Los datos muestran que la respuesta inmune humoral al rotavirus tras la infección y tras la vacunación no se limita a una respuesta sistémica en suero, sino que también se produce una respuesta complementaria a nivel de la mucosa oral. Este hecho había sido descrito previamente por otros autores (202, 205-209) y está basado en la teoría de sitios inductores y efectores del sistema inmune de la mucosa (172-174) que explica como se producen anticuerpos específicos frente a un agente que infecta en un lugar anatómico distante. Prácticamente el total de la IgA hallada en saliva es de origen local, y tan solo una mínima parte proviene de la exudación del plasma, a diferencia de otros isotipos (IgG e IgM) que derivan totalmente del plasma (210, 211)

Sin embargo, a pesar de producirse la respuesta humoral en ambos compartimentos (suero y saliva), el nivel de conversión (seroconversión y “salivaconversión”) que viene dado por el valor de GMFR, es mucho mayor en suero que en saliva, tanto tras la infección natural como tras la vacunación (Tablas 1 y 2). Este hecho indicaría que la respuesta sistémica producida en respuesta al rotavirus es de mucha mayor magnitud que la respuesta local en la mucosa oral, como también se pone de manifiesto por los valores finales de GMT alcanzados (el doble en caso de la infección natural y tres veces en respuesta a la vacunación) (Gráficas 1 y 2). Este hecho avala la teoría que

apunta que la estimulación inmune a nivel intestinal no es un buen modo de generar anticuerpos IgA en saliva (212)

6.1.1 Rotavirus-IgA salivar como correlato de protección alternativo

Actualmente se considera a los RV-IgA séricos como el correlato de protección más adecuado frente al rotavirus (138), a pesar de sus limitaciones, como por ejemplo la pobre correlación existente entre niveles de RV-IgA séricos y protección en países en vías de desarrollo (79) Este factor hace prioritario la búsqueda de un correlato de protección alternativo al correlato sérico. En esta línea parece obvio pensar en la IgA intestinal como un buen correlato de protección (79, 134, 213), dado que rotavirus infecta al ser humano a través de la mucosa intestinal, es lógico que conseguir altos niveles protectores de RV-IgA en intestino correlacionarían con un buen nivel de protección. El problema radicaría entonces en la inaccesibilidad de estos anticuerpos para su medición y estudio, por ello se plantea a la RV-IgA salivar como un buen marcador subrogado de protección.

Sin embargo, a la vista de nuestros resultados, presentar la RV-IgA salivar como correlato de protección alternativo no sería conveniente, dado los pobres valores de conversión en saliva obtenidos y los niveles de GMT alcanzados, que parecen indicar que la respuesta de IgA salivar no refleja fielmente la respuesta de IgA intestinal. Previamente se había observado en respuesta a otras vacunas entéricas orales como *Salmonella typhi* (214) y cólera (215) que las respuestas de IgA salivar no eran consistentes y

evidenciaban no mostrar correlación aparente con las respuestas de IgA intestinal.

Por tanto, la IgA salivar podría indicar solamente contacto con el virus o ingesta de la vacuna, pero difícilmente podría representar la IgA intestinal o correlacionarse con protección. Sin embargo, hay que tener en cuenta también otras variables que podrían influenciar los niveles de anticuerpos en saliva, como son la reproducibilidad y estandarización de los inmunoensayos, las diferencias en el flujo salivar entre los individuos, pérdida de proteínas durante el procesamiento de la muestra o la posible interferencia en la medición entre IgA monomérica y dimérica.

6.1.2 Interferencia de la lactancia materna en el cálculo de la conversión

Nuestros resultados muestran además que otro factor para tener en cuenta si queremos considerar los valores de RV-IgA salivar, es la interferencia que muestra la lactancia materna (Tabla 3) a la hora de su medición.

Según nuestros datos, aquellos pacientes con lactancia materna durante la toma de muestra previa a la vacunación o a la infección, presentan contaminación con RV-IgA maternos lo que impediría realizar un cálculo real de conversión salivar. En las gráficas 3 y 4 se muestra como el porcentaje de individuos que convierten y los valores de conversión en saliva (GMFR) cambian significativamente según el tipo de lactancia, mientras que los valores séricos son independientes de la lactancia.

Influencia de la lactancia materna sobre la inmunogenicidad de la vacunación

Un aspecto que ha sido extensivamente discutido en la literatura es la influencia de la lactancia materna en la inmunogenicidad de una vacuna oral como la de rotavirus. La leche materna contiene, como así hemos demostrado con nuestros datos, anticuerpos RV-IgA maternos que podrían de algún modo neutralizar los virus vacunales e interferir con la respuesta inmune a la vacunación (216-218) Sin embargo, un reciente ensayo clínico llevado a cabo en Pakistán con la vacuna monovalente frente a rotavirus concluía sin embargo que la lactancia materna no interfería con los valores de RV-IgA séricos alcanzados e incluso aquellos niños que mantenían la lactancia materna mostraban valores de seroconversión más altos (219)

Nuestros datos muestran, en una cohorte diferente correspondiente a un país desarrollado y con la vacuna pentavalente frente al rotavirus, los mismos resultados que los de este ensayo clínico. No observamos ningún impacto de la lactancia materna en los valores de GMT finales alcanzados tanto en suero como en saliva (Gráfico 5) En nuestro caso, los valores de seroconversión (GMFR) aunque nominalmente son superiores en el grupo de lactancia materna respecto al grupo de lactancia artificial, estas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas (Gráfico 6).

Podemos concluir por tanto a la vista de nuestros resultados que la presencia de RV-IgA de origen materno en el momento de ingesta de la vacunación no afecta a la inmunogenicidad de la vacuna en términos de niveles de anticuerpos producidos.

6.1.3 Diferencias en los niveles de anticuerpos alcanzados mediante la infección natural y la vacunación

Los resultados del estudio no muestran diferencias significativas en los valores de GMT en suero y saliva finales alcanzados tras la infección natural y tras la vacunación (Tabla 4) Si bien los valores de seroconversión muestran diferencias significativas, estas son debidas a las diferencias en los valores basales de anticuerpos entre ambas cohortes. La razón de estas diferencias radicaría en las diferentes edades entre ambas cohortes y/o en la posibilidad de infecciones subclínicas previas en la cohorte infectados.

Si bien el análisis de estos resultados presenta como limitación el bajo número de pacientes analizados en la cohorte infectados, podemos concluir que tanto a nivel de mucosa oral como a nivel sistémico no se aprecian diferencias significativas en la respuesta de anticuerpos RV-IgA entre ambas cohortes.

Recientemente, un trabajo publicado en Finlandia concluía que la respuesta de Anticuerpos frente a la proteína de cápside de rotavirus VP6 era similar tras la infección natural y tras la vacunación con RotaTeq® (220) Este hallazgo está en línea con nuestros resultados basados en anticuerpos IgA totales frente a rotavirus, en suero y saliva.

6.1.4 Correlación entre los compartimentos sérico y mucosa oral

Los estudios de asociación realizados entre los valores obtenidos de RV-IgA en ambos compartimentos (sistémico y saliva) indican que no existe correlación alguna entre las respuestas humorales en suero y saliva (Gráfico 8) Estaríamos hablando, por tanto, de respuestas independientes y no relacionadas, generadas a partir del mismo estímulo. Si bien, estudios previos indicaban una asociación entre los valores de IgA intestinal y los valores séricos (208, 221), nuestros resultados muestran que esa asociación no es extrapolable a la mucosa oral.

Sin embargo, en el caso de vacunas sistémicas si se ha demostrado una correlación positiva entre los valores obtenidos en suero y en saliva, como es el caso de la vacuna polisacárida conjugada frente a meningococo (222) Parece, por tanto, que la vía de administración condiciona la asociación entre las respuestas de ambos compartimentos.

Ya se discutió previamente la conveniencia del uso del RV-IgA salivar como correlato de protección alternativo al sérico. El hecho de que no haya correlación entre ambos compartimentos apoya el uso de la saliva como un posible correlato alternativo, si bien los bajos valores de conversión encontrados y las limitaciones e interferencias presentes en saliva, lo desaconsejan desde nuestro punto de vista.

6.2 Respuesta de citocinas en suero y en mucosa oral tras la infección natural de rotavirus y tras la vacunación

El patrón de citocinas liberado durante la respuesta inmunitaria o persistente tras la infección nos muestra una visión importante del proceso inmune que se ha desarrollado (223). Esta respuesta se produce normalmente a las pocas horas de la infección o del contacto con el patógeno y la persistencia en el tiempo dependerá del tiempo de resolución del proceso y de la intensidad de la reacción (224). Por lo tanto, según las muestras tomadas en nuestro estudio debemos interpretar tres momentos bien diferenciados: **basal** (previo al contacto con el patógeno) que correspondería a la muestra *Pre-Dosis 1* de la cohorte vacunados; **fase aguda** (*fase aguda* de la infección) y **recuperación** tras la infección/vacunación, que correspondería a las muestras de *convalecencia* (cohorte infectados) y *Post-Dosis 3* (cohorte vacunados).

6.2.1 *Respuesta inmune mediada por citocinas en respuesta a la infección por rotavirus en mucosa oral*

6.2.1.1 *Respuesta proinflamatoria del epitelio mucosa oral*

Los datos obtenidos muestran por primera vez en la literatura, que la infección natural por rotavirus produce en fase aguda una respuesta mediada por citocinas en la mucosa oral. Las células del epitelio oral reconocen la invasión del patógeno a través de sus receptores innatos específicos y son estimuladas a producir citocinas. Esta respuesta de

citocinas por parte de células de epitelio oral se había demostrado previamente durante infecciones o inflamaciones locales (225), pero es la primera vez que se demuestra durante una infección intestinal como el rotavirus, para la cual no hay evidencia de que infecte la cavidad bucal.

Se observan diferencias significativas en los niveles de varias citocinas en los pacientes durante la fase aguda de la infección (Tabla 6), lo que sugiere una respuesta sistémica a la infección por rotavirus, que incluye la mucosa oral. Los datos muestran también que se trata de una respuesta coordinada asociada a un incremento de citocinas proinflamatorias, lo que indica una transferencia de la respuesta inflamatoria que se produce a nivel intestinal hacia la saliva en una forma perfectamente orquestada.

Los pacientes en fase aguda de la infección muestran niveles incrementados de varias citocinas asociadas a respuesta inmune innata, particularmente IL-22 pero también IL-6, IL-8 e IL-1 β (Gráfico 9) Todas ellas son citocinas proinflamatorias que actúan atrayendo diversas células inmunitarias como polimorfonucleares hacia el lugar de la infección. La mayoría de estas citocinas son producidas por el epitelio en respuesta a la entrada del patógeno (226, 227) Por tanto, aunque no hay evidencia hasta la fecha de entrada de partículas de rotavirus en el interior de la mucosa oral, nuestros datos sugieren que la mucosa oral produce una respuesta inmune a través de la liberación de mediadores proinflamatorios, presumiblemente a través de la comunicación inmunitaria entre la mucosa intestinal y la mucosa oral, mostrando una respuesta

inmune global en toda la mucosa del huésped en respuesta a la infección por rotavirus.

Otras citocinas de origen adaptativo como el IFN- γ , producida principalmente por los linfocitos T, no se ha encontrado diferencialmente expresado en los pacientes, lo que indicaría que el sistema inmune adaptativo no participaría al menos en la respuesta inmune en la mucosa oral. El IFN- λ , relacionada con la defensa epitelial frente a patógenos virales tampoco no fue detectada en nuestro estudio.

6.2.1.2 Participación de la IL-22 en la respuesta inmune en la mucosa oral

La citocina que más notablemente se mostró incrementada con respecto a sus valores basales fue la IL-22, citocina no asociada a síntesis epitelial. Esta citocina es principalmente sintetizada por células linfoides innatas tipo 3 (ILC-3), células dendríticas y células NK (228) No hay evidencia de síntesis de IL-22 por las células epiteliales, por tanto su presencia en la mucosa oral está asociada a una respuesta inmune de células linfoides innatas, sugiriendo la presencia de células linfoides activadas en la mucosa oral en respuesta a la infección intestinal. La diana principal para esta citocina son las células epiteliales donde actúa como potente mediador del proceso inflamatorio frente a los patógenos invasores (229) En modelos experimentales de ratón, la administración de IL-22 en células epiteliales intestinales produjo la eliminación de la infección por rotavirus actuando como agente antiviral de amplio espectro (230) También se ha

relacionada con funciones protectoras en el epitelio a través de su acción regeneradora en el epitelio dañado tras la infección (229, 231, 232)

Por tanto, nuestros resultados muestran que no solo se produce una respuesta por parte de las células epiteliales en respuesta a la infección intestinal por rotavirus, sino que también se detecta implicación de las células linfoides innatas en esta respuesta.

6.2.1.3 Alteración en la producción del IFN- α_2 en la mucosa

Un dato bastante significativo encontrado en nuestro estudio de citocinas en saliva de pacientes infectados es que los valores de IFN- α_2 se encontraron significativamente descendidos durante la fase aguda de la infección en comparación con la fase de convalecencia y con los valores basales de esta citocina. Varios estudios indican que la expresión constitutiva de interferón tipo I en las superficies mucosas juega un importante papel en el control de la proliferación y función del epitelio, regulando la renovación epitelial (233-235) Los rotavirus han desarrollado una amplia variedad de mecanismos dirigidos a evadir la respuesta antiviral del interferón tipo I del huésped con el objetivo de alcanzar un nivel de replicación óptimo en el epitelio del huésped (236) por ejemplo evitando la detección de componentes virales o inhibiendo la función de los factores de transcripción que inician la respuesta del interferón (237) Sin embargo, es poco probable que los valores descendidos de IFN- α_2 observados en la mucosa oral en fase aguda de la infección por rotavirus sean debidos a una inhibición específica promovida por el rotavirus, dado

que no hay evidencia de entrada del rotavirus en el epitelio oral. Parece mas probable que el daño producido en la mucosa intestinal conlleve una interferencia en la homeostasis normal de producción del interferón a lo largo de todo el sistema de mucosas.

6.2.1.4 Asociación de los valores de EGF con estancia hospitalaria

Otro parámetro encontrado elevado en las muestras de saliva recogidas en fase aguda en los pacientes infectados es el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Gráfico 9) Esta proteína, está vinculada a la regeneración del epitelio tras una lesión mucosa, estimulando la cicatrización de heridas y la reparación del tejido (238) Estudios previos en modelos animales de cerdos neonatales infectados con rotavirus apuntan hacia un papel beneficioso contar con niveles fisiológicos altos de EGF en estimular la recuperación del epitelio intestinal tras la infección (239) Por otro lado, la aplicación de EGF en la mucosa puede promover la proliferación intestinal y mejorar la recuperación tras una lesión intestinal, y podría ser un tratamiento efectivo en el síndrome de isquemia-reperfusión en modelos animales (240) Otros autores, basándose en estudios animales, proponían la hipótesis de suplementación con EGF tras una lesión intestinal como potencial tratamiento que mejoraba el pronóstico de los pacientes (241) lo que abría la puerta a un novedoso posible tratamiento de recuperación tras la infección por rotavirus.

Según nuestros resultados, los valores de EGF se encuentran aumentados durante la infección natural con rotavirus. Esta

sobreexpresión de los valores de EGF en los pacientes infectados podría sugerir una respuesta de recuperación por parte del huésped al daño inducido en la mucosa intestinal por la infección del rotavirus. La pérdida de la homeostasis normal de la mucosa induciría la síntesis de EGF a lo largo de toda la mucosa con el objetivo de recuperar la integridad de esta tras la infección.

Además, nuestros resultados muestran una asociación de los valores de EGF con la duración de la estancia hospitalaria (Gráfico 15) Cuanto mayor eran los niveles de EGF en las muestras de fase aguda de pacientes infectados, más corta era la estancia hospitalaria. Se podría argumentar que mayores niveles de EGF reflejarían una respuesta más poderosa de recuperación de la homeostasis en la mucosa, facilitando la recuperación y resultando en una menor estancia hospitalaria. Esta asociación, de confirmarse prospectivamente, permitiría realizar predicciones sobre estancia hospitalaria y recuperación de la integridad de la mucosa a través de un biomarcador no-invasivo como es la saliva. Sin embargo, debemos señalar como una limitación importante de nuestro estudio el limitado número de individuos analizados.

6.2.1.5 Asociación entre otras citocinas encontradas en saliva y gravedad de la enfermedad

Además del EGF, otras citocinas encontradas en saliva durante la fase aguda de la enfermedad mostraban asociación con parámetros clínicos de gravedad determinados por el score clínico de gravedad de Vesikari

(Tabla 10) Las citocinas que mostraban asociación significativa fueron IFN- γ , IL-6, IL-10 e IL-12. Sin embargo, de todas ellas solamente la IL-6 mostró diferencias ligeramente significativas entre los valores en fase aguda y los valores de convalecencia, por ello la interpretación de esta asociación clínica debe ser hecha con precaución.

6.2.1.6 Perfil de citocinas en suero de pacientes infectados se asocia con gravedad de la enfermedad

Los valores de citocinas obtenidos en el suero de los pacientes infectados y tras el periodo de convalecencia muestran varias citocinas con valores significativamente alterados durante la fase aguda de la infección (Tabla 6) Así, nos encontramos elevaciones significativas en EGF, IL-8, IL-1 β , IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ . Los cambios más significativos se producen en EGF y en IFN- γ . El aumento sérico de la molécula de EGF vendría a confirmar lo mismo que observamos en saliva y estaría en línea con la misma argumentación que el aumento en la mucosa, esto es, intento de recuperación de la mucosa dañada tras la infección. Por otro lado, IFN- γ es una citocina liberada por una gran variedad de células inmunitarias entre las que destacan la célula T CD4+ y la célula NK, y constituye un potente activador de la respuesta inmune innata frente a virus a través de la activación de los macrófagos y sus capacidades fagocíticas (242) Otras citocinas significativamente elevadas corresponden a un perfil pro-inflamatorio, como son IL-8, IL-1 β y TNF- α , producidas por múltiples estirpes celulares y que activan el estado de inflamación sistémica en el

huésped. Estos resultados vienen a confirmar el carácter sistémico de la infección por rotavirus, no limitándose la inflamación al compartimento intestinal sino que se traduce en la elevación de marcadores inflamatorios sistémicos específicos, como otros autores habían descrito anteriormente (243)

Sin embargo, nuestros resultados muestran por primera vez en la literatura una asociación entre los valores séricos de algunas citocinas y varios parámetros clínicos de gravedad recogidos en el score de Vesikari (Tabla 11) que no muestran dependencia con la edad del paciente. De este modo, podemos establecer un perfil de citocinas séricas (IFN- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-12) que muestran una asociación positiva con el score de gravedad de Vesikari (Gráfico 16) Hasta la fecha, la estratificación de gravedad en la infección por rotavirus se realiza en base a escalas exclusivamente clínicas que no incorporan ningún parámetro de laboratorio (244) Sería interesante evaluar de acuerdo a estos resultados si la incorporación de este perfil de citocinas séricas a las actuales escalas de clasificación de la gravedad podrían aportar algo.

6.2.2 Respuesta inmune mediada por citocinas en respuesta a la vacunación

El análisis de citocinas tras la vacunación frente a rotavirus muestra como no se producen cambios significativos en sus valores en suero y saliva (Tabla 7) Estos resultados indican que la vacunación no produciría inflamación sistémica, al menos que perdure un mes después de la última dosis de vacuna.

6.2.3 Comparación entre la respuesta de citocinas en la infección natural y tras la vacunación

A la hora de poder comparar la respuesta mediada por citocinas entre las cohortes de pacientes infectados y vacunados, debemos analizar comparativamente los valores obtenidos tras la recuperación de la infección (convalecencia) y tras la pauta completa de vacunación (post-dosis 3) dado que el resto de las muestras no son comparables entre sí por ser obtenidas en momentos diferentes del proceso inmunitario.

De este modo, observamos como existen diferencias entre los valores alcanzados tras la infección y tras la vacunación, siendo generalmente mayores los valores que se alcanzan en el periodo de convalecencia tras la infección natural (Tabla 8) La explicación más sencilla a esta observación es que durante el proceso de vacunación no se producen cambios significativos en los valores sistémicos y salivares de citocinas, dado que la respuesta inflamatoria o bien no se produce o bien no es tan exacerbada como durante la infección. De todas formas, para confirmar este hecho deberíamos haber analizado la muestra recogida a las 24-48 horas de la toma de la vacuna, para recoger la “fase aguda” de la respuesta inmune a la vacunación.

Así, nos encontramos en saliva con valores de citocinas proinflamatorias (IL-8, IL-12, TNF- α e IL-22) mayores durante la convalecencia que los observados tras completar la pauta completa de vacunación. En el caso

de la molécula de IFN- α en saliva, se observan valores más elevados tras la vacunación que en convalecencia (Gráfico 14) Este hecho confirmaría la inhibición en la síntesis de IFN- α salivar que se observa en la fase aguda de la infección, discutida anteriormente. Estos resultados parecen indicar que durante el proceso de vacunación no se produce ese proceso de inhibición, seguramente porque durante la vacunación no se produce daño en la mucosa intestinal o al menos no tan intenso como para producir la inhibición del IFN- α en toda la mucosa.

A nivel sérico, igualmente se observan valores de citocinas por lo general más elevados en la fase de convalecencia que tras el periodo de vacunación (Gráfico 13), lo que también sugiere la hipótesis que durante la vacunación no se produciría una respuesta inflamatoria sistémica, o bien esta sería de mucha menor intensidad porque los niveles no perduran en el tiempo.

6.2.4 Comparación entre la respuesta de citocinas en suero y saliva

Igual que la respuesta basada en anticuerpos, tanto en la infección natural como en la vacunación, observamos que la respuesta inmune mediada por citocinas es diferente en ambos compartimentos (Tablas 12 y 13) No se observa ninguna correlación entre los valores en saliva y los valores en suero, lo que refleja una respuesta independiente producida por tipos celulares diferentes y por tanto no se podría usar la saliva como marcador no invasivo de respuesta mediada por citocinas sistémica en el caso de la

infección por rotavirus. Previamente un estudio realizado en individuos sanos había identificado correlación entre suero y saliva para la IL-6, IFN- γ y MIP-1 β (245) aunque esta asociación no había podido ser confirmado en otro trabajo (246) Los nuestros son los primeros datos que demuestran la no asociación entre ambos compartimentos en la infección/vacunación por rotavirus.

6.3 Análisis de la respuesta inmune celular a diferentes antígenos de rotavirus en ambas cohortes

El ensayo de estimulación en sangre completa nos permite obtener, desde una perspectiva diferente a la medición directa de citocinas en suero, una visión de los tipos celulares implicados en la respuesta inmunitaria frente al rotavirus. A través de la estimulación con diferentes antígenos de rotavirus analizamos el comportamiento de las células inmunitarias tras la infección natural y la vacunación.

6.3.1 Respuesta inmune celular en el paciente infectado

La estimulación con diferentes antígenos de rotavirus (salvaje y vacunal) de las células del paciente durante la fase aguda de la infección por rotavirus muestra que se produce una potente respuesta mediada por citocinas que incluye principalmente producción de IFN- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α (Gráfico 18) Destaca sobre todo la síntesis de las citocinas proinflamatorias IL-8, IL-6 e IL-1 β (esta última solo en respuesta al antígeno vacunal) en línea con los resultados encontrados en el

apartado anterior. No se observa tras la estimulación síntesis de IL-12, IL-15 y la síntesis de IFN- γ es muy baja y apenas muestra diferencias con respecto al basal.

Sin embargo, lo más interesante del estudio de estimulación radica en las diferencias encontradas en la respuesta de citocinas a ambos antígenos de rotavirus. Así, podemos observar como durante la fase aguda de la infección, **la respuesta es mucho mayor frente al antígeno vacunal de rotavirus** (reasortantes de rotavirus humano-bovinos) en la síntesis de IL-1 β , IL-6 e IL-8. Destaca la producción de **IL-1 β** en respuesta al antígeno vacunal e inexistente en respuesta al antígeno salvaje. Estos resultados, aunque no se confirman en la cohorte de pacientes vacunados, indican una respuesta inflamatoria mayor en respuesta al antígeno vacunal, lo que sugiere una mayor inmunogenicidad que el rotavirus salvaje

6.3.2 Respuesta inmune celular en el paciente vacunado

En esta cohorte el estudio de las muestras previas y posteriores a la vacunación nos permiten evaluar el cambio en el comportamiento de las células inmunitarias tras la vacunación. Así podemos ver en la Tabla 15 y los Gráficos 19 y 20 el perfil de citocinas liberadas en respuesta a ambos antígenos de rotavirus en las muestras obtenidas previo y posteriores a la vacunación. Las gráficas muestran que el perfil de citocinas liberado es similar antes y después de la vacunación, y se centra en la producción principalmente de IL-8, IL-6, IL-1 β , IFN- α , IL-10 y TNF- α . No se detectan producción de IFN- γ e IL-12.

6.3.3 Cambios en el perfil de citocinas tras la vacunación

Sin embargo, el hallazgo más significativo es la **producción de IL-15 tras la vacunación**. Los individuos vacunados producen IL-15 mientras que los individuos no vacunados no la producen. Este hecho ocurre, además, en respuesta a ambos antígenos de rotavirus.

Estos resultados sugieren que la IL-15 podría tener un papel fundamental en el mecanismo de protección generado tras la vacunación por rotavirus, hecho que no hemos observado que ocurra durante la infección natural. La IL-15 es una citocina expresada por varios tipos celulares y tejidos, incluyendo monocitos, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos y células epiteliales intestinales (247) cuya función principal es participar en el desarrollo, la activación y proliferación de las células NK (248) Esta citocina ya había sido identificada previamente en un modelo de infección por rotavirus como factor clave liberado por las células epiteliales intestinales y que participaba en el reclutamiento de células NK (249)

La memoria inmune generada tras la vacunación con rotavirus produciría un mecanismo a través del cual se induce la producción de IL-15 como factor clave en la defensa frente al rotavirus a través del reclutamiento y la activación de células NK en el lugar de la infección.

La producción de IL-15 no es el único cambio que se produce en el individuo tras la vacunación. Así, podemos observar en los gráficos 21 y 22 como el nivel de expresión de IL-8, IL-1 β y TNF- α se altera tras la

vacunación. La estimulación con ambos antígenos de rotavirus en el individuo vacunado produce niveles significativamente menores de estas citocinas que antes de la vacunación. Desconocemos si esta variación en estas citocinas consideradas proinflamatorias es fisiológicamente relevante como para poder afirmar que la respuesta tras la vacunación es menos inflamatoria que en el individuo sin vacunar.

6.3.3.1 Diferencias entre el antígeno de rotavirus empleado

La respuesta mediada por citocinas tras la vacunación también difiere ligeramente según el antígeno de rotavirus empleado. Observamos, a diferencia de la cohorte en fase aguda de la infección, una mayor producción de IFN- α e IL-1 β en la estimulación con el antígeno salvaje de rotavirus que con el antígeno vacunal. El resto de las citocinas no presenta cambios en su producción con los diferentes estímulos.

En general podemos concluir que no existen grandes diferencias en las respuestas de citocinas a ambos antígenos empleados, y solamente merece la pena destacar la ausencia de producción de IL-1 β en respuesta al antígeno salvaje en fase aguda de la infección.

6.3.4 Comparación de la respuesta entre ambas cohortes

Las respuestas mediadas por citocinas se han medido en momentos diferentes en las dos cohortes. No se obtuvieron durante el ensayo

muestras de sangre para estimulación en la fase de convalecencia tras la infección, por lo que no pudimos realizar la comparación entre la respuesta post-infección y post-vacunación.

Sin embargo, podemos comparar la respuesta en fase aguda de la infección con respecto al basal o control sano de la muestra Pre-Dosis 1 y es lo que se representa en el Gráfico 22. Así, observamos que, durante la fase aguda de la infección, la respuesta de citocinas IFN- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α eran de menor magnitud que en los individuos control, tras estimulación principalmente con antígeno salvaje de rotavirus. Este hecho podría indicar cierto grado de “agotamiento” de las células inmunes durante la fase aguda de la infección, en comparación con las células inmunes de los individuos control. La producción de citocinas inflamatorias durante la fase aguda de una infección viral tiene su pico máximo a las 48 horas del inicio de la infección, tras lo cual las células inmune innatas entran en un estado de “exhausto” y la producción de citocinas disminuye (250) Al intentar re-estimular estas células durante nuestro ensayo de estimulación, la producción de estas citocinas, principalmente liberadas por macrófagos y células dendríticas, disminuye con respecto a la muestra control. En el caso del IFN- α está bien documentado que las células inmunes entran en un fenotipo de descanso a los 5 días del inicio de la infección viral, tras los cuales la capacidad de sintetizar moléculas de interferón tipo I disminuye considerablemente en los días posteriores, produciendo un período de inmunosupresión que aumenta la susceptibilidad a otras infecciones virales (251)

6.3.5 Asociación entre la respuesta mediada por citocinas y el curso clínico de la enfermedad

La capacidad de las células inmunes en producir ciertas citocinas puede determinar el curso clínico de la enfermedad (252). Así podemos ver en la Tabla 16 como encontramos una asociación positiva entre los niveles de IL-10 liberados en respuesta al rotavirus y el tiempo de hospitalización. La IL-10 es conocida como el factor de inhibición de síntesis de citocinas (253), es considerada una citocina antiinflamatoria, actúa inhibiendo la actividad de células T, células NK y macrófagos (254). Su función es suprimir la respuesta inflamatoria una vez se ha producido, evitando una excesiva activación inmunitaria que podría producir complicaciones graves de la infección (255) Por lo tanto, nuestros resultados indicarían que aquellos individuos en fase aguda de la infección con tendencia a producir mayores niveles de IL-10 en respuesta al rotavirus, tendrían un mayor tiempo de recuperación y por tanto de estancia hospitalaria, debido a que mostrarían un mayor control inhibitorio de la respuesta inmunológica.

Por otro lado, y en línea con esta teoría, encontramos una asociación negativa entre los valores de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 e IL-8 con el grado de gravedad de la infección alcanzado. Esto indicaría que aquellos individuos en fase aguda de la infección con mayor capacidad de sintetizar estas citocinas proinflamatorias resolverían mejor la infección alcanzando valores del score de gravedad menores. Estas citocinas juegan un papel importante en el reclutamiento y en la activación

de las células inmunes, por tanto una mayor capacidad de síntesis de estas citocinas en la fase aguda de la infección participaría en un modo positivo en el control de la infección viral, como se ha demostrado previamente en otras infecciones (256, 257)

6.3.6 Correlación entre la inmunidad celular y la inmunidad humoral en el paciente vacunado

La respuesta inmunitaria es una respuesta coordinada entre los diferentes brazos que componen el sistema inmune: humoral y celular. Existe una interacción funcional entre las células B y las células inmunes innatas productoras de citocinas (258) Analizando los datos obtenidos en cuanto a la capacidad del individuo de generar citocinas en respuesta a un estímulo viral y a la capacidad de producción de anticuerpos específicos en respuesta a la vacunación, observamos una relación significativa entre la capacidad de producción de IL-15 y TNF- α con el nivel de anticuerpos IgA frente a rotavirus alcanzado (Tabla 17, Gráfico 23) IL-15, junto a la IL-2 e IL-21, es capaz de activar la proliferación de linfocitos B y la producción de anticuerpos, además de su función activadora de las células NK (259) Más aun, numerosos estudios indican la efectividad de incorporar la IL-15 como adyuvante vacunal con el objetivo aumentar la respuesta celular y humoral a la vacuna (260-262) Por otro lado, entre las actividades de TNF- α se encuentran la modulación inmune de la función de las células B (263, 264) Por tanto ambas citocinas están relacionadas con la producción de anticuerpos y con la modulación de las células B. Nuestros datos corroboran esta asociación y demuestran un papel importante de ambas

citocinas en la producción de anticuerpos tras la vacunación frente a rotavirus. La capacidad de producción de anticuerpos específicos tras la vacunación se relacionaba positivamente con la capacidad para producir estas citocinas en el individuo.

6.4 Estudio comparativo de los perfiles moleculares de inmunización humoral tras la infección natural y tras la vacunación

La inmunidad adquirida por vía natural y la adquirida artificialmente a través de la vacunación constituyen dos procesos inmunológicos diferentes, aunque comparten el mismo fin: generar memoria celular y producción de anticuerpos protectores específicos. Sin embargo, los perfiles moleculares reconocidos por los anticuerpos generados en ambos procesos no tienen por qué coincidir. Descifrar la respuesta inmune humoral a la vacunación es necesaria para entender los requerimientos de una inmunidad protectora y diseñar nuevos candidatos vacunales.

En nuestro estudio hemos identificado proteínas virales que solo son reconocidas por los anticuerpos generados tras la infección natural (NSP2), proteínas solo reconocidas tras la vacunación (VP2, VP3), así como una proteína de rotavirus (NSP4) que no es reconocida en ningún caso.

La enterotoxina de rotavirus NSP4 ha mostrado en diferentes estudios tener menor inmunogenicidad que otras proteínas virales (265, 266) con porcentajes de seroconversión del 54% tras infección natural y del 8% tras

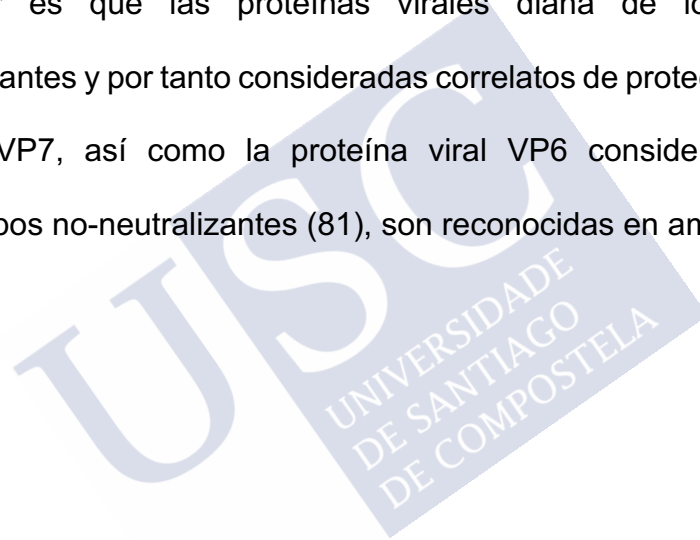
vacunación con la vacuna tetravalente de rotavirus (RRV-TV) (125) por lo que es factible que nuestros datos no muestren reconocimiento. Se trata de una lipoproteína oligomérica secretada en complejos con fosfolípidos tras la infección de la célula por el rotavirus (267), lo que dificultaría el reconocimiento por parte del sistema inmune y la generación de anticuerpos.

En el caso de la NSP2, solo reconocida en nuestro estudio por las muestras obtenidas tras la infección natural, se trata de una proteína no estructural de unión a ARN que se acumula en los viroplasmos citoplasmáticos en desarrollo de la célula infectada y que tiene un papel esencial en la replicación del genoma viral (268) Dado que la vacunación se realiza con una cepa de rotavirus atenuada, se supone que el grado de replicación viral en las células intestinales será mucho menor que durante la infección con una cepa salvaje. Por tanto, cabe la posibilidad que la proteína NSP2, cuya máxima expresión se produce durante la replicación del genoma viral, no alcance nivel suficiente para ser reconocida por el sistema inmunitario durante la vacunación.

En cuanto a las proteínas virales VP2 y VP3, no reconocidas por el individuo tras la infección natural y si tras la vacunación, cabe la teoría de que ambas proteínas tienen su origen en una cepa de rotavirus bovina (WC3) por lo que ello podría suponer una mayor inmunogenicidad que las de la cepa de rotavirus humana de la infección natural. Ambas proteínas

se corresponden además con proteínas estructurales situadas en el interior del core viral (2)

Por tanto, en nuestro estudio hemos identificado perfiles de inmunización humoral diferenciales entre el paciente vacunado e infectado, aunque solo hemos podido hacer el estudio cualitativo y no cuantitativo debido a la falta de muestra suficiente. Desconocemos la implicación clínica que las diferencias en estos perfiles podrían suponer, aunque lo que si podemos observar es que las proteínas virales diana de los anticuerpos neutralizantes y por tanto consideradas correlatos de protección como son VP4 y VP7, así como la proteína viral VP6 considerada diana de anticuerpos no-neutralizantes (81), son reconocidas en ambos casos.



6.5 Análisis del transcriptoma en el paciente infectado y vacunado

6.5.1 Análisis global del transcriptoma en el paciente infectado

Los resultados del análisis global del transcriptoma del paciente infectado comparado con el grupo control (muestras pre-vacunación) muestran como la infección por rotavirus conduce a una serie de cambios globales en la maquinaria de transcripción de las células infectadas que afectan a la expresión de aproximadamente 500 genes (Gráfico 25). Principalmente, la infección por rotavirus produce un aumento en la expresión de genes implicados tanto en el ciclo celular como en la condensación de la cromatina. En las células eucariotas, el ciclo celular es controlado a través de una compleja maquinaria de genes que pueden ser potencialmente manipulados por muchos virus en favor de su replicación (269). Se ha observado un aumento de las células en la fase S del ciclo celular durante los estadios iniciales de la infección, algo que se ha relacionado con un beneficio para el ciclo vital del virus y se han propuesto varios mecanismos moleculares que explicarían estos beneficios (270). Recientemente se ha demostrado que rotavirus induce acumulación de las células en fase S, lo que es concurrente con la inducción de la expresión de la proteína calmodulina y activación de la proteína quinasa dependiente de calcio CaMK1, conocida por su papel en la inducción de la transición de fase G1 a S (271). Estos autores también demuestran que la infección por rotavirus produce la activación del factor de transcripción E2F, involucrado en el control del ciclo celular y de las quinasas dependientes de ciclinas G1. Nuestros resultados apoyan esa

teoría como se muestra en el Gráfico 28. Además, encontramos que la expresión de estos genes se encuentra altamente correlacionado, lo que es compatible con una regulación directa de estos genes sobre el ciclo celular.

Aparte de las alteraciones medidas por la infección por rotavirus observadas en la célula huésped, nuestro estudio también identifica un número de genes relacionados con respuesta inmune que muestran importantes diferencias con respecto al grupo control. Así, observamos que la vía KEGG asociada a la infección por malaria se encontraba alterada en los niños infectados por rotavirus. En esta vía, los genes *IFI27* e *IL-12* se encontraban activados. El aumento en la expresión del gen *IFI27* es muy remarcable y garantiza futuras investigaciones. Este gen pertenece a una familia de genes inducidos por *IFN- α* de función desconocida (272, 273), aunque recientemente vinculada a proliferación epidérmica y relacionada con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (274) Este aumento de la expresión del gen *IFI27* ha sido reportada previamente en otras enfermedades infecciosas como la gripe (275) Igualmente interesante es que no observamos en nuestros datos una alteración significativa del gen *IFN- γ* , lo que coincide con los estudios previos (237, 276)

6.5.1.1 *Inhibición de los genes para la glicoforina*

Uno de los hallazgos más remarcables de nuestro trabajo es la observación de una fuerte inhibición de los genes para la glicoforina A/B (*GYPA/B*). *GYPA* es la sialoglicoproteína más abundante en la superficie del eritrocito y constituye el determinante antigénico para el grupo sanguíneo MNS. Además, estos genes solo se expresan en la superficie del eritrocito. Diversos patógenos usan las glicoproteínas de superficie del eritrocito como receptor para invadir células diana, y se ha reportado el uso de la glicoforina como receptor celular específico de penetración en el huésped para el virus de la hepatitis A (277), el parvovirus bovino (278), virus Sendai (279), influenza A y B (280), reovirus (281) y rotavirus del grupo C (282). Paradójicamente, la glicoforina es el principal receptor en el eritrocito para la invasión del parásito de la malaria *Plasmodium falciparum* que infecta a los eritrocitos (283).

Por tanto, la capacidad del rotavirus para aglutinar eritrocitos parece ser mediada por compuestos que contienen ácido siálico. Además, las glicoproteínas de superficie del eritrocito funcionan como receptor señuelo que atraen los patógenos al eritrocito anucleado y lo mantiene lejos de su tejido diana (284, 285). Es de destacar que esta compleja red de interacciones implica también al gen *SLC4A1* que se encuentra inhibido en los pacientes infectados como se puede observar en el Gráfico 29.

Estos resultados sugieren que el rotavirus también ha desarrollado mecanismos moleculares para evadir la respuesta defensiva del huésped

mediada por las glicoproteínas *GYPA/B* del eritrocito. Esta observación encuentra apoyo en resultados previos que indican que la infectividad de muchos rotavirus animales es dependiente de la interacción de la proteína viral VP4 con receptores que contienen ácido siálico (286) De hecho, el tratamiento de las células con sialidasas inhibe la hemaglutinación y reduce la unión del rotavirus a la célula huésped y reduce la infectividad (286).

De forma general, estos resultados sugieren un mecanismo de defensa del huésped para evadir la infección viral, a través de una inhibición en la expresión de los receptores que emplea el virus para la penetración en el huésped. Un mecanismo de defensa similar se ha descrito en la infección con rinovirus, donde se produce una inhibición en la expresión de los receptores ICAM-1 mediada por el IFN- γ en las células epiteliales respiratorias, proporcionando un estado anti-viral (287).

6.5.2 Análisis centrado en genes de respuesta inmune

Además de la sobreexpresión del gen *IFI27* observada, podemos relacionar un total de 75 genes relacionados con la respuesta inmunitaria que se encuentran diferencialmente expresados durante la infección por rotavirus respecto al grupo control (Tabla 20) Del estudio de la función de estos genes se deducen varios factores.

En primer lugar, analizando los genes de respuesta inmune inhibidos, nos encontramos en primer lugar con una potente inhibición de la **proteína reguladora del complemento C4BPA**. Esta proteína inhibe la acción de

la vía clásica y la vía de las lectinas del complemento, a través de su unión a C4 (288) Este hecho indicaría que durante la infección por rotavirus se potencia la activación del complemento, regulando a la baja los factores inhibidores de su activación. Esta inhibición en la expresión de C4BPA ha sido demostrada previamente en la infección por *Chlamydia pneumoniae* (289)

Otra proteína significativamente inhibida es **TRIM58**, proteína que interactúa con el receptor toll-like tipo 2 (TLR-2) regulando negativamente su expresión en las células inmunes (290) y por tanto se considera un mediador negativo del control del sistema inmune innato, conteniendo la inflamación a nivel de la mucosa intestinal (291). La inhibición en su expresión en respuesta a la infección por rotavirus supone por tanto un mecanismo de potenciación de la respuesta inmune innata en la mucosa intestinal, hasta la fecha no identificado previamente en ninguna infección.

A nivel de señalización observamos una inhibición en los genes para las **quimiocinas CXCL10 y CXCL5**, así como para el **receptor de IL-5** y parte del componente del **receptor de la IL-1**. Desconocemos si la inhibición en estos genes relacionados con quimiotaxis y activación de células inflamatorias es producida por el rotavirus como mecanismo de evasión o indican simplemente una modulación de la respuesta inmune por parte del huésped.

Llama poderosamente la atención la inhibición en la expresión de tres **genes relacionados con los eosinófilos** como son el receptor para la IL-5 (IL5RA), el receptor SIGLEC8 y el receptor de alta afinidad para IgE (FcER1A), todos ellos de expresión principal en eosinófilos, aunque también pueden estar presentes en basófilos y mastocitos. No hemos encontrado relación entre la inhibición de estos genes y la infección por rotavirus, desconociendo la razón de esta inhibición.

En cuanto a los genes que muestran un aumento en la expresión durante la infección por rotavirus con respecto al grupo control, destacan una serie de grandes grupos de genes relacionados principalmente con **respuesta citotóxica**, principalmente centrada en la activación de la **célula NK**, genes de **respuesta a interferón** y genes relacionados con **activación de células B y producción de inmunoglobulinas**.

En primer lugar, destacan una serie de genes relacionados con respuesta citotóxica (21 genes relacionados) entre los que se incluyen principalmente genes relacionados directamente con la activación y diferenciación de células NK (16 genes) entre los que destacan el factor de transcripción **ZBTB32** y la proteína **BIRC5** por su alta expresión en estos individuos. La expresión de ZBTB32 es inducida por citocinas inflamatorias y promueve activamente la proliferación de las células NK (292) Este factor de transcripción actúa como una señal celular a través del cual las citocinas inflamatorias dan instrucciones a las células NK de pasar a un estado de proliferación permitiendo una activa expansión

clonal en respuesta a la infección viral (293) Por otro lado, BIRC5, es una proteína inhibidora de apoptosis que mantiene la supervivencia de las células NK tras su activación. En la infección por VIH, se ha demostrado como BIRC5 promueve la supervivencia de las células T CD4+ infectadas (294) También se encuentran sobreexpresados los genes para las enzimas características de las células NK como son la granzimas y metaloproteinasas con actividad proteolítica.

Por tanto, estos resultados identifican a las células NK y la respuesta citotóxica como elemento clave en la defensa frente al rotavirus.

Otro grupo de genes que se encuentran sobreexpresados durante la infección por rotavirus son los genes relacionados con la respuesta al interferón, donde podemos identificar hasta nueve genes relacionados, entre los que destacan el gen IFI27 ya mencionado anteriormente y otros como **IFI44** e **IFI44L**, relacionados también con infección por virus hepatitis C y que activa un estado antiproliferativo en la célula (295)

Además, se observa la expresión aumentada de varios genes relacionados con la activación de células B y producción de inmunoglobulinas (nueve genes). Destaca la expresión de **IGJ**, que codifica para la proteína J que permite la unión de los dímeros de IgA y pentámeros de IgM y es expresada por las células plasmáticas (296) y la chaperona **MZB1** expresada a nivel del centro germinal que participa en la síntesis de inmunoglobulinas (297) Otras proteínas importantes

relacionadas con las células B son el antígeno de maduración de célula B (**BCMA o TNFRSF17**) y la proteína **TACI**, ambos factores principales durante el desarrollo y la activación de las células B (298, 299).

Por último, destaca la expresión aumentada del **sensor de ARN viral ZBP1** relacionado con activación de la inmunidad innata (300) Hasta la fecha no se ha identificado el sensor que detecta el ARN de rotavirus tras la penetración en la célula. Según nuestros resultados, el sensor ZBP1 podría ser candidato al encontrarse aumentada diferencialmente su expresión en los pacientes infectados por rotavirus. Además, esta teoría es favorecida dada la alta expresión de esta proteína en el intestino (301) La activación de ZBP1 resulta en la activación del inflammasoma, la regulación de la muerte de la célula infectada y el inicio de la respuesta pro-inflamatoria, eventos típicos que ocurren tras la infección de las células intestinales por el rotavirus.

6.5.3 Análisis global del transcriptoma en el paciente vacunado

Como era de esperar no se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes en las muestras tras la vacunación comparado con el grupo control previo a la vacunación.

6.6 Caracterización de la respuesta inmune celular tras la infección y la vacunación

El estudio de las poblaciones celulares realizado tras el ensayo de estimulación con antígeno de rotavirus salvaje nos permitió analizar el comportamiento de las principales poblaciones celulares T, B y NK, así como el porcentaje de células activadas.

Aunque no es factible realizar comparaciones entre ambas cohortes, dado que como ya se ha explicado antes corresponde a momentos diferentes de la respuesta inmune (fase aguda de la infección vs recuperación tras la vacunación) lo que si nos permite es analizar el grado de proliferación y el nivel de activación de estas poblaciones celulares en respuesta al antígeno de rotavirus.

Como podemos observar en el Gráfico 34, los cambios celulares que se producen tras el estímulo *in vitro* de la sangre completa en fase aguda de la infección por rotavirus, se reducen a un pequeño incremento en la población de células T CD8+, no observándose alteración en el número de células T CD4+ ni células NK. Esto se explica por el estado de proliferación basal ya existente (fase aguda de la infección) que no experimenta apenas cambios tras una estimulación *in vitro*.

Donde si se observan cambios es en el porcentaje de células activadas tras la estimulación *in vitro* con el antígeno de rotavirus, dado que en los tres tipos celulares podemos observar como aumenta significativamente

el nivel de expresión del marcador de activación CD69. Por tanto, en fase aguda de la infección, no se produce proliferación celular, pero si aumenta el nivel de activación de las células en respuesta al antígeno de rotavirus in vitro.

Algo muy diferente ocurre con las muestras tomadas en la fase de recuperación tras recibir la última dosis de vacunación (Gráfico 35). En este caso, se trata de un estado de reposo inmunitario, que alteramos al realizar una estimulación in vitro con el antígeno de rotavirus. Lo que se observa tras la estimulación es una proliferación de las células T CD8+ y células NK, acompañada de un aumento en el nivel de expresión del marcador de activación linfocitaria CD69 a nivel de los tres tipos celulares.

Por tanto, analizando ambos casos podemos concluir que, en respuesta al antígeno de rotavirus, se produce una proliferación a nivel de células citotóxicas como los linfocitos T-CD8+ y células NK, manteniéndose estable el número de linfocitos T-CD4+. Esto no quiere decir que los linfocitos T-CD4+ no intervienen en la reacción inmune al rotavirus, dado que se demuestra aumenta su nivel de activación tras el estímulo.

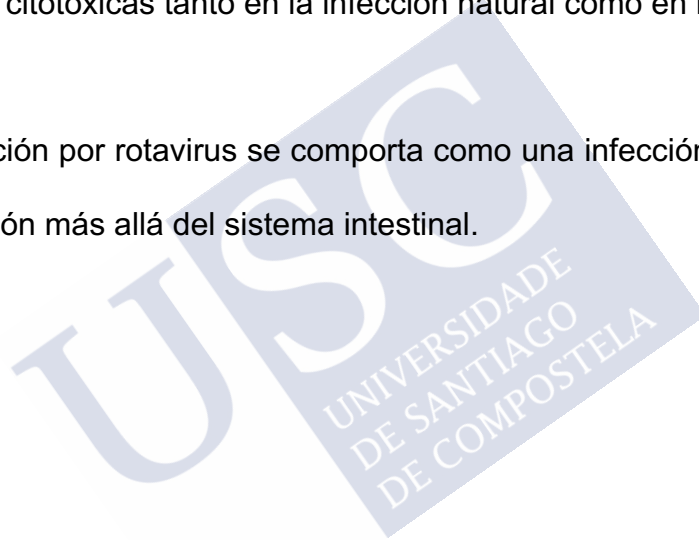
Estos hallazgos confirman estudios previos en individuos sanos donde observaban un aumento del numero y actividad de linfocitos citotóxicos tras la estimulación con rotavirus (127, 302)

7 CONCLUSIONES

1. La infección natural por rotavirus y la vacunación frente a rotavirus producen una respuesta inmune humoral en mucosa oral independiente de la respuesta sistémica.
2. La IgA frente a rotavirus en saliva no es un buen reflejo de la inmunidad intestinal a la vista de los pobres valores de conversión alcanzados, por lo que no parece un buen candidato a correlato de protección en la inmunidad frente a rotavirus.
3. La presencia de IgA frente a rotavirus de origen materno en el momento de la toma de la vacuna no afecta a la inmunogenicidad de la vacuna.
4. Los niveles de anticuerpos frente a rotavirus observados en suero y en saliva son similares tanto en la infección natural y como en la vacunación frente a rotavirus.
5. La infección por rotavirus produce una respuesta inflamatoria en mucosa oral de los pacientes que no se limita a las células del epitelio oral y que incluye la implicación de células inmunes innatas productoras del IL-22.
6. La infección por rotavirus produce una alteración global de la homeostasis de la mucosa que no se limita a la mucosa intestinal, y que también involucra la mucosa oral de forma específica.

7. Identificamos al Epidermal Growth Factor (EGF) en saliva como biomarcador de regeneración de la mucosa tras la infección y asociado a la estancia hospitalaria.
8. Identificamos un perfil de citocinas inflamatorias sistémicas (IFN- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-12) asociadas con la gravedad de la enfermedad por rotavirus.
9. La vacunación frente a rotavirus, a diferencia de la infección natural, no produce una respuesta mediada por citocinas inflamatorias sistémica o esta es de mucha menor intensidad.
10. La respuesta mediada por citocinas tanto en la infección natural como tras la vacunación frente a rotavirus, es independiente en suero y saliva
11. Se identifica la IL-15 como una citocina con un papel fundamental en el mecanismo de protección conferido tras la vacunación con rotavirus
12. La capacidad de los individuos de producir un determinado patrón de citocinas, se asocia con la estancia hospitalaria y el nivel de anticuerpos producidos
13. La vacunación frente a rotavirus y la infección natural generan perfiles de inmunización humoral diferenciales
14. Identificamos un posible mecanismo de defensa del huésped frente al rotavirus a través de la inhibición en la expresión de los genes para la glicoforina, necesaria para los receptores del rotavirus en el epitelio intestinal

15. Identificamos tres grandes grupos de genes de respuesta inmune a la infección por rotavirus centrados en 1) respuesta celular NK citotóxica, 2) activación de células B; y 3) producción de inmunoglobulinas, y genes de respuesta al interferón
16. Identificamos la proteína ZBP1 como un posible sensor de detección del ARN de rotavirus en la célula
17. La respuesta inmune frente a rotavirus activa poblaciones de células NK y T-CD8 citotóxicas tanto en la infección natural como en la vacunación
18. La infección por rotavirus se comporta como una infección sistémica con implicación más allá del sistema intestinal.



8 PERSPECTIVAS FUTURAS

La infección por rotavirus es una infección sistémica y produce una respuesta inmunitaria global en la que están implicados diferentes componentes del sistema inmune a nivel sistémico y a nivel de la mucosa. La caracterización de la respuesta inmunitaria frente a la infección natural y frente a la vacunación realizada en el presente trabajo de tesis nos permite avanzar en el conocimiento de los mecanismos de protección generados. La búsqueda de correlatos de protección debe continuar y debe incluir componentes de la respuesta inmune celular y humoral que hemos ayudado a caracterizar. La respuesta inmune frente al rotavirus es global y sistémica, por tanto, los correlatos de protección deben incluir los diferentes componentes activados.

Por otro lado, en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de los efectos heterólogos de las vacunas, en especial de las vacunas vivas atenuadas, como por ejemplo el Bacilo de Calmette-Guerin (BCG) y su protección frente a otras infecciones no-relacionadas. El conocimiento de los mecanismos de protección generados tras la vacunación con rotavirus ayudará en los próximos años a caracterizar mecanismos similares de protección frente a otras infecciones gastrointestinales como por ejemplo norovirus, a través del entrenamiento inmunitario que la vacuna frente al rotavirus pudiese generar.

Más aún, las vacunas frente a rotavirus han demostrado muy recientemente en estudios epidemiológicos una asociación protectora frente al desarrollo de enfermedades autoinmunitarias como la diabetes y la enfermedad celíaca. El

conocimiento de los mecanismos inmunitarios que subyacen tras esta asociación, nos permitirá conocer por un lado el proceso a través del cual las infecciones virales son desencadenantes de determinados procesos autoinmunitarios, y por otro lado diseñar estrategias de prevención específicas frente a ellas, actualmente inexistentes.



9 Anexo: Producción científica derivada de la tesis

8.1. Publicación en revistas con revisión por pares

El presente trabajo de tesis ha permitido la publicación de **NUEVE artículos científicos indexados en el JCR:**

1: Pardo-Seco J, Cebey-López M, Martínón-Torres N, Salas A, GÓMEZ-RIAL J, Rodríguez-Tenreiro C, Martínón-Sánchez JM, Martínón-Torres F. **Impact of Rotavirus Vaccination on Childhood Hospitalization for Seizures.** *Pediatr Infect Dis J.* 2015 Jul;34(7):769-73. doi: 10.1097/INF.0000000000000723. **JCR (2018): 2.317**

2: Salas A, Marco-Puche G, Triviño JC, Gómez-Carballa A, Cebey-López M, Rivero-Calle I, Vilanova-Trillo L, Rodríguez-Tenreiro C, GÓMEZ-RIAL J, Martínón-Torres F. **Strong down-regulation of glycoporphin genes: A host defense mechanism against rotavirus infection.** *Infect Genet Evol.* 2016 Oct;44:403-411. doi: 10.1016/j.meegid.2016.07.044. Epub 2016 Aug 2. PubMed PMID: 27491455. **JCR (2018): 2.611**

3: GÓMEZ-RIAL J, Curras-Tuala MJ, Rivero-Calle I, Rodríguez-Tenreiro C, Redondo-Collazo L, Gómez-Carballa A, Pardo-Seco J, Salas A, Martínón-Torres F. **Rotavirus intestinal infection induces an oral mucosa cytokine response.** *PLoS One.* 2018 Apr 5;13(4):e0195314. doi: 10.1371/journal.pone.0195314. eCollection 2018. PubMed PMID: 29621276; PubMed Central PMCID: PMC5886481. **JCR (2018): 2.776**

4: GÓMEZ-RIAL J, Curras-Tuala MJ, Talavero-González C, Rodríguez-Tenreiro C, Vilanova-Trillo L, Gómez-Carballa A, Rivero-Calle I, Justicia-Grande A, Pardo-Seco J, Redondo-Collazo L, Salas A, Martínón-Torres F.

Salivary epidermal growth factor correlates with hospitalization length in rotavirus infection.

BMC Infect Dis. 2017 May 30;17(1):370. doi: 10.1186/s12879-017-2463-0. PubMed PMID: 28558652; PubMed Central PMCID: PMC5450176. **JCR (2018): 2.565**

5: Rivero-Calle I, GÓMEZ-RIAL J, Martínón-Torres F.

Systemic features of rotavirus infection.

J Infect. 2016 Jul 5;72 Suppl:S98-S105. doi: 10.1016/j.jinf.2016.04.029. Epub 2016 May 12. PubMed PMID: 27181101. **JCR (2018): 5.099**

6: GÓMEZ-RIAL J, Sánchez-Batán S, Rivero-Calle I, Pardo-Seco J, Martínón-Martínez JM, Salas A, Martínón-Torres F.

Rotavirus infection beyond the gut.

Infect Drug Resist. 2018 Dec 24; 12:55-64. doi: 10.2147/IDR.S186404. eCollection 2019. Review. PubMed PMID: 30636886; PubMed Central PMCID: PMC6307677. **JCR (2018): 3.000**

7: GÓMEZ-RIAL J, Sánchez-Batán S, Rivero-Calle I, Pardo-Seco J, Martínón-Martínez JM, Salas A, Martínón-Torres F. **Further considerations on rotavirus vaccination and seizure-related hospitalization rates.**

Infect Drug Resist. 2019 Apr 29; 12:989-991. doi: 10.2147/IDR.S208756. eCollection 2019. **JCR (2018): 3.000**

8: Salas A, Pardo-Seco J, Cebey-López M, Martínón-Martínez JM, GÓMEZ-RIAL J, Currás-Tuala MJ, Pischedda S, Barral-Arca R, Justicia-Grande A, Rivero-Calle I, Vilar J, Martínón-Torres F. **Impact of rotavirus vaccination on childhood hospitalizations for seizures: Heterologous or unforeseen direct vaccine effects?**

Vaccine. 2019 May 31;37(25):3362-3368. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.04.086. Epub 2019 May 4. **JCR (2018): 3.269**

9: GÓMEZ-RIAL J, Rivero-Calle I, Salas A, Martínón-Torres F. **Rotavirus and Autoimmunity.**

Journal of Infection 2020 Apr 30. pii: S0163-4453(20)30267-X. doi: 10.1016/j.jinf.2020.04.041. **JCR (2018): 5.099**



Para el presente trabajo de tesis se han empleado imágenes propias, elaboradas por el autor, a excepción de las imágenes de las Figuras 2 y 8, para las cuales se ha obtenido el consiguiente permiso de la editorial (a continuación):

Permiso de utilización de la imagen de la **Figura 2:**

Copyright Clearance Center RightsLink® Home Help Email Support Sign in Create Account

Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection
Author: Robert F. Ramig
Publication: Journal of Virology
Publisher: American Society for Microbiology
Date: Sep 14, 2004
Copyright © 2004, American Society for Microbiology

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

Permissions Request
ASM authorizes an advanced degree candidate to republish the requested material in his/her doctoral thesis or dissertation. If your thesis, or dissertation, is to be published commercially, then you must reapply for permission.

BACK CLOSE WINDOW

© 2020 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Terms and Conditions
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customer care@copyright.com

Permiso de utilización de la imagen de la **Figura 8:**

Copyright Clearance Center RightsLink® Home Help Email Support Jose Gomez-Rial

Mucosal immunization: A realistic alternative
Author: Diana C. Otczyk , Allan W. Cripps
Publication: Human Vaccines & Immunotherapeutics
Publisher: Taylor & Francis
Date: Dec 1, 2010
Rights managed by Taylor & Francis

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group
Journal Reprints

Thesis/Dissertation Reuse Request
Taylor & Francis is pleased to offer reuses of its content for a thesis or dissertation free of charge contingent on resubmission of permission request if work is published.

BACK CLOSE

© 2020 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Terms and Conditions
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customer care@copyright.com

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Bernstein DI. Rotavirus overview. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(3 Suppl):S50-3.
2. Kirkwood CD. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. *J Infect Dis.* 2010;202 Suppl:S43-8.
3. Patton JT. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med.* 2012;13(68):85-97.
4. Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev.* 1989;53(4):410-49.
5. Ludert JE, Krishnaney AA, Burns JW, Vo PT, Greenberg HB. Cleavage of rotavirus VP4 in vivo. *J Gen Virol.* 1996;77 (Pt 3):391-5.
6. Nava P, Lopez S, Arias CF, Islas S, Gonzalez-Mariscal L. The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 23):5509-19.
7. Perez N, Garbarg-Chenon A, Fourgeux C, Le Deist F, Servant-Delmas A, Charpilienne A, et al. The VP6 protein of rotavirus interacts with a large fraction of human naive B cells via surface immunoglobulins. *J Virol.* 2004;78(22):12489-96.
8. Hoshino Y, Kapikian AZ. Classification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes. *Arch Virol Suppl.* 1996;12:99-111.
9. Kaufhold RM, Field JA, Caulfield MJ, Wang S, Joseph H, Wooters MA, et al. Memory T-cell response to rotavirus detected with a gamma interferon enzyme-linked immunospot assay. *J Virol.* 2005;79(9):5684-94.

10. Pham T, Perry JL, Dosey TL, Delcour AH, Hyser JM. The Rotavirus NSP4 Viroporin Domain is a Calcium-conducting Ion Channel. *Sci Rep.* 2017;7:43487.
11. Ousingsawat J, Mirza M, Tian Y, Roussa E, Schreiber R, Cook DI, et al. Rotavirus toxin NSP4 induces diarrhea by activation of TMEM16A and inhibition of Na⁺ absorption. *Pflugers Arch.* 2011;461(5):579-89.
12. Estes MK, Kang G, Zeng CQ, Crawford SE, Ciarlet M. Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. *Novartis Found Symp.* 2001;238:82-96; discussion - 100.
13. Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology.* 2009;136(6):1939-51.
14. Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol.* 2004;78(19):10213-20.
15. Lundgren O, Svensson L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect.* 2001;3(13):1145-56.
16. Tian P, Estes MK, Hu Y, Ball JM, Zeng CQ, Schilling WP. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 1995;69(9):5763-72.
17. Dong Y, Zeng CQ, Ball JM, Estes MK, Morris AP. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(8):3960-5.
18. Hagbom M, Istrate C, Engblom D, Karlsson T, Rodriguez-Diaz J, Buesa J, et al. Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog.* 2011;7(7):e1002115.

19. Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, Kordasti S, Uhnöo I, Svensson L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*. 2000;287(5452):491-5.
20. Osborne MP, Haddon SJ, Spencer AJ, Collins J, Starkey WG, Wallis TS, et al. An electron microscopic investigation of time-related changes in the intestine of neonatal mice infected with murine rotavirus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1988;7(2):236-48.
21. Clark SM, Roth JR, Clark ML, Barnett BB, Spendlove RS. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *J Virol*. 1981;39(3):816-22.
22. Estes MK, Graham DY, Mason BB. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J Virol*. 1981;39(3):879-88.
23. Trask SD, Kim IS, Harrison SC, Dormitzer PR. A rotavirus spike protein conformational intermediate binds lipid bilayers. *J Virol*. 2010;84(4):1764-70.
24. Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK, Lawton JA, Shaw AL, Ramig RF, et al. Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J Virol*. 2001;75(13):6052-61.
25. Rodriguez JM, Chichon FJ, Martin-Forero E, Gonzalez-Camacho F, Carrascosa JL, Caston JR, et al. New insights into rotavirus entry machinery: stabilization of rotavirus spike conformation is independent of trypsin cleavage. *PLoS Pathog*. 2014;10(5):e1004157.
26. Huang P, Xia M, Tan M, Zhong W, Wei C, Wang L, et al. Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J Virol*. 2012;86(9):4833-43.

27. Liu Y, Huang P, Tan M, Liu Y, Biesiada J, Meller J, et al. Rotavirus VP8*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens. *J Virol.* 2012;86(18):9899-910.
28. Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, et al. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature.* 2012;485(7397):256-9.
29. Jiang X, Liu Y, Tan M. Histo-blood group antigens as receptors for rotavirus, new understanding on rotavirus epidemiology and vaccine strategy. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(4):e22.
30. Payne DC, Currier RL, Staat MA, Sahni LC, Selvarangan R, Halasa NB, et al. Epidemiologic Association Between FUT2 Secretor Status and Severe Rotavirus Gastroenteritis in Children in the United States. *JAMA Pediatr.* 2015;169(11):1040-5.
31. Silva-Ayala D, Lopez T, Gutierrez M, Perrimon N, Lopez S, Arias CF. Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(25):10270-5.
32. Arias CF, Silva-Ayala D, Lopez S. Rotavirus entry: a deep journey into the cell with several exits. *J Virol.* 2015;89(2):890-3.
33. Graham KL, Fleming FE, Halasz P, Hewish MJ, Nagesha HS, Holmes IH, et al. Rotaviruses interact with alpha4beta7 and alpha4beta1 integrins by binding the same integrin domains as natural ligands. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 12):3397-408.
34. Collaborators GBDDD. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis

for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(9):909-48.

35. 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.

36. Gurwith M, Wenman W, Hinde D, Feltham S, Greenberg H. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. *J Infect Dis.* 1981;144(3):218-24.

37. Velazquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, et al. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 1996;335(14):1022-8.

38. Grimwood K, Lambert SB. Rotavirus vaccines: opportunities and challenges. *Hum Vaccin.* 2009;5(2):57-69.

39. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD, World Health Organization-Coordinated Global Rotavirus Surveillance N. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. *Clin Infect Dis.* 2016;62 Suppl 2:S96-S105.

40. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17083.

41. Patel MM, Pitzer VE, Alonso WJ, Vera D, Lopman B, Tate J, et al. Global seasonality of rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(4):e134-47.

42. Soriano-Gabarro M, Mrukowicz J, Vesikari T, Verstraeten T. Burden of rotavirus disease in European Union countries. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25(1 Suppl):S7-S11.

43. Ehlken B, Laubereau B, Karmaus W, Petersen G, Rohwedder A, Forster J, et al. Prospective population-based study on rotavirus disease in Germany. *Acta Paediatr.* 2002;91(7):769-75.
44. Berner R, Schumacher RF, Hameister S, Forster J. Occurrence and impact of community-acquired and nosocomial rotavirus infections--a hospital-based study over 10 y. *Acta Paediatr Suppl.* 1999;88(426):48-52.
45. Fruhwirth M, Berger K, Ehlken B, Moll-Schuler I, Brosl S, Mutz I. Economic impact of community- and nosocomially acquired rotavirus gastroenteritis in Austria. *Pediatr Infect Dis J.* 2001;20(2):184-8.
46. Thuret A, Patural H, Berthelot P, Benzait F, Martin I, Jusot JF, et al. [Prospective follow-up of hospital-acquired diarrhoea in 28 paediatric wards of the south-east part of France during a winter season]. *Pathol Biol (Paris).* 2004;52(3):131-7.
47. Piednoir E, Bessaci K, Bureau-Chalot F, Sabouraud P, Brodard V, Andreoletti L, et al. Economic impact of healthcare-associated rotavirus infection in a paediatric hospital. *J Hosp Infect.* 2003;55(3):190-5.
48. Gianino P, Mastretta E, Longo P, Laccisaglia A, Sartore M, Russo R, et al. Incidence of nosocomial rotavirus infections, symptomatic and asymptomatic, in breast-fed and non-breast-fed infants. *J Hosp Infect.* 2002;50(1):13-7.
49. Luquero Alcalde FJ, Eiros Bouza JM, Rubio AP, Bachiller Luque MR, Castrodeza Sanz JJ, Ortiz de Lejarazu Leonardo R. Gastroenteritis by rotavirus in Spanish children. Analysis of the disease burden. *Eur J Pediatr.* 2008;167(5):549-55.
50. Zissis G, Lambert JP, Marbehant P, Marissens D, Lobmann M, Charlier P, et al. Protection studies in colostrum-deprived piglets of a bovine rotavirus

vaccine candidate using human rotavirus strains for challenge. *J Infect Dis.* 1983;148(6):1061-8.

51. Vesikari T, Isolauri E, D'Hondt E, Delem A, Andre FE, Zissis G. Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet.* 1984;1(8384):977-81.

52. Clark HF, Borian FE, Bell LM, Modesto K, Gouvea V, Plotkin SA. Protective effect of WC3 vaccine against rotavirus diarrhea in infants during a predominantly serotype 1 rotavirus season. *J Infect Dis.* 1988;158(3):570-87.

53. Christy C, Madore HP, Pichichero ME, Gala C, Pincus P, Vosefski D, et al. Field trial of rhesus rotavirus vaccine in infants. *Pediatr Infect Dis J.* 1988;7(9):645-50.

54. Hanlon P, Hanlon L, Marsh V, Byass P, Shenton F, Hassan-King M, et al. Trial of an attenuated bovine rotavirus vaccine (RIT 4237) in Gambian infants. *Lancet.* 1987;1(8546):1342-5.

55. Lanata CF, Black RE, del Aguila R, Gil A, Verastegui H, Gerna G, et al. Protection of Peruvian children against rotavirus diarrhea of specific serotypes by one, two, or three doses of the RIT 4237 attenuated bovine rotavirus vaccine. *J Infect Dis.* 1989;159(3):452-9.

56. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Perez-Schael I. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J Infect Dis.* 1996;174 Suppl 1:S65-72.

57. Joensuu J, Koskenniemi E, Pang XL, Vesikari T. Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. *Lancet.* 1997;350(9086):1205-9.

58. Perez-Schael I, Guntinas MJ, Perez M, Pagone V, Rojas AM, Gonzalez R, et al. Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *N Engl J Med.* 1997;337(17):1181-7.
59. Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH, Bernstein DI, Pichichero ME, Zito ET, et al. Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines--report of the National Multicenter Trial. United States Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *Pediatrics.* 1996;97(1):7-13.
60. Rotavirus vaccine for the prevention of rotavirus gastroenteritis among children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 1999;48(RR-2):1-20.
61. Centers for Disease C, Prevention. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine--United States, 1998-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1999;48(27):577-81.
62. Murphy TV, Gargiullo PM, Massoudi MS, Nelson DB, Jumaan AO, Okoro CA, et al. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N Engl J Med.* 2001;344(8):564-72.
63. Peter G, Myers MG, National Vaccine Advisory C, National Vaccine Program O. Intussusception, rotavirus, and oral vaccines: summary of a workshop. *Pediatrics.* 2002;110(6):e67.
64. Burke RM, Tate JE, Kirkwood CD, Steele AD, Parashar UD. Current and new rotavirus vaccines. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32(5):435-44.
65. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med.* 2006;354(1):23-33.

66. Dennehy PH. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(1):198-208.
67. Block SL, Vesikari T, Goveia MG, Rivers SB, Adeyi BA, Dallas MJ, et al. Efficacy, immunogenicity, and safety of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine at the end of shelf life. *Pediatrics.* 2007;119(1):11-8.
68. Parashar UD, Alexander JP, Glass RI, Advisory Committee on Immunization Practices CfDC, Prevention. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 2006;55(RR-12):1-13.
69. Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2006;354(1):11-22.
70. Bhandari N, Rongsen-Chandola T, Bavdekar A, John J, Antony K, Taneja S, et al. Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian children in the second year of life. *Vaccine.* 2014;32 Suppl 1:A110-6.
71. Naik SP, Zade JK, Sabale RN, Pisal SS, Menon R, Bankar SG, et al. Stability of heat stable, live attenuated Rotavirus vaccine (ROTASIIL(R)). *Vaccine.* 2017;35(22):2962-9.
72. Vesikari T, Ruuska T, Koivu HP, Green KY, Flores J, Kapikian AZ. Evaluation of the M37 human rotavirus vaccine in 2- to 6-month-old infants. *Pediatr Infect Dis J.* 1991;10(12):912-7.
73. Barnes GL, Lund JS, Mitchell SV, De Bruyn L, Piggford L, Smith AL, et al. Early phase II trial of human rotavirus vaccine candidate RV3. *Vaccine.* 2002;20(23-24):2950-6.

74. Bines JE, At Thobari J, Satria CD, Handley A, Watts E, Cowley D, et al. Human Neonatal Rotavirus Vaccine (RV3-BB) to Target Rotavirus from Birth. *N Engl J Med.* 2018;378(8):719-30.
75. Groome MJ, Koen A, Fix A, Page N, Jose L, Madhi SA, et al. Safety and immunogenicity of a parenteral P2-VP8-P[8] subunit rotavirus vaccine in toddlers and infants in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(8):843-53.
76. Tamminen K, Lappalainen S, Huhti L, Vesikari T, Blazevic V. Trivalent combination vaccine induces broad heterologous immune responses to norovirus and rotavirus in mice. *PLoS One.* 2013;8(7):e70409.
77. Wang Y, Azevedo M, Saif LJ, Gentsch JR, Glass RI, Jiang B. Inactivated rotavirus vaccine induces protective immunity in gnotobiotic piglets. *Vaccine.* 2010;28(33):5432-6.
78. Desselberger U, Huppertz HI. Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *J Infect Dis.* 2011;203(2):188-95.
79. Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Curr Opin Virol.* 2012;2(4):419-25.
80. Franco MA, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine.* 2006;24(15):2718-31.
81. Clarke E, Desselberger U. Correlates of protection against human rotavirus disease and the factors influencing protection in low-income settings. *Mucosal Immunol.* 2015;8(1):1-17.

82. Broquet AH, Hirata Y, McAllister CS, Kagnoff MF. RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. *J Immunol.* 2011;186(3):1618-26.
83. Pott J, Stockinger S, Torow N, Smoczek A, Lindner C, McInerney G, et al. Age-dependent TLR3 expression of the intestinal epithelium contributes to rotavirus susceptibility. *PLoS Pathog.* 2012;8(5):e1002670.
84. Sen A, Rothenberg ME, Mukherjee G, Feng N, Kalisky T, Nair N, et al. Innate immune response to homologous rotavirus infection in the small intestinal villous epithelium at single-cell resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(50):20667-72.
85. Holloway G, Coulson BS. Innate cellular responses to rotavirus infection. *J Gen Virol.* 2013;94(Pt 6):1151-60.
86. Sen A, Pruijssers AJ, Dermody TS, Garcia-Sastre A, Greenberg HB. The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3. *J Virol.* 2011;85(8):3717-32.
87. Silvestri LS, Taraporewala ZF, Patton JT. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *J Virol.* 2004;78(14):7763-74.
88. Barro M, Patton JT. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(11):4114-9.
89. Graff JW, Mitzel DN, Weisend CM, Flenniken ML, Hardy ME. Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. *J Virol.* 2002;76(18):9545-50.

90. Barro M, Patton JT. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *J Virol.* 2007;81(9):4473-81.
91. Arnold MM, Patton JT. Diversity of interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains. *J Virol.* 2011;85(5):1970-9.
92. De Boissieu D, Lebon P, Badoual J, Bompard Y, Dupont C. Rotavirus induces alpha-interferon release in children with gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1993;16(1):29-32.
93. La Bonnardiere C, Cohen J, Contrepois M. Interferon activity in rotavirus infected newborn calves. *Ann Rech Vet.* 1981;12(1):85-91.
94. Deal EM, Jaimes MC, Crawford SE, Estes MK, Greenberg HB. Rotavirus structural proteins and dsRNA are required for the human primary plasmacytoid dendritic cell IFNalpha response. *PLoS Pathog.* 2010;6(6):e1000931.
95. Holloway G, Truong TT, Coulson BS. Rotavirus antagonizes cellular antiviral responses by inhibiting the nuclear accumulation of STAT1, STAT2, and NF-kappaB. *J Virol.* 2009;83(10):4942-51.
96. Vancott JL, McNeal MM, Choi AH, Ward RL. The role of interferons in rotavirus infections and protection. *J Interferon Cytokine Res.* 2003;23(3):163-70.
97. Sheth R, Anderson J, Sato T, Oh B, Hempson SJ, Rollo E, et al. Rotavirus stimulates IL-8 secretion from cultured epithelial cells. *Virology.* 1996;221(2):251-9.
98. Casola A, Garofalo RP, Crawford SE, Estes MK, Mercurio F, Crowe SE, et al. Interleukin-8 gene regulation in intestinal epithelial cells infected with rotavirus: role of viral-induced I kappa B kinase activation. *Virology.* 2002;298(1):8-19.

99. Yason CV, Schat KA. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: clinical signs and virology. *Am J Vet Res.* 1987;48(6):977-83.
100. Casola A, Estes MK, Crawford SE, Ogra PL, Ernst PB, Garofalo RP, et al. Rotavirus infection of cultured intestinal epithelial cells induces secretion of CXC and CC chemokines. *Gastroenterology.* 1998;114(5):947-55.
101. Rollo EE, Kumar KP, Reich NC, Cohen J, Angel J, Greenberg HB, et al. The epithelial cell response to rotavirus infection. *J Immunol.* 1999;163(8):4442-52.
102. Stadnyk AW. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can J Gastroenterol.* 2002;16(4):241-6.
103. Graff JW, Ettayebi K, Hardy ME. Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. *PLoS Pathog.* 2009;5(1):e1000280.
104. Weitkamp JH, Kallewaard NL, Bowen AL, Lafleur BJ, Greenberg HB, Crowe JE, Jr. VH1-46 is the dominant immunoglobulin heavy chain gene segment in rotavirus-specific memory B cells expressing the intestinal homing receptor alpha4beta7. *J Immunol.* 2005;174(6):3454-60.
105. Youngman KR, Franco MA, Kuklin NA, Rott LS, Butcher EC, Greenberg HB. Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response. *J Immunol.* 2002;168(5):2173-81.
106. Lopez-Guerrero DV, Meza-Perez S, Ramirez-Pliego O, Santana-Calderon MA, Espino-Solis P, Gutierrez-Xicotencatl L, et al. Rotavirus infection activates dendritic cells from Peyer's patches in adult mice. *J Virol.* 2010;84(4):1856-66.

107. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(8):594-606.
108. Brown KA, Offit PA. Rotavirus-specific proteins are detected in murine macrophages in both intestinal and extraintestinal lymphoid tissues. *Microb Pathog.* 1998;24(6):327-31.
109. Velazquez FR. Protective effects of natural rotavirus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(3 Suppl):S54-6.
110. Barron-Romero BL, Barreda-Gonzalez J, Doval-Ugalde R, Zermeno-Eguia Liz J, Huerta-Pena M. Asymptomatic rotavirus infections in day care centers. *J Clin Microbiol.* 1985;22(1):116-8.
111. Banerjee I, Gladstone BP, Le Fevre AM, Ramani S, Iturriza-Gomara M, Gray JJ, et al. Neonatal infection with G10P[11] rotavirus did not confer protection against subsequent rotavirus infection in a community cohort in Vellore, South India. *J Infect Dis.* 2007;195(5):625-32.
112. Chiba S, Yokoyama T, Nakata S, Morita Y, Urasawa T, Taniguchi K, et al. Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. *Lancet.* 1986;2(8504):417-21.
113. Ward R. Mechanisms of protection against rotavirus infection and disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(3 Suppl):S57-9.
114. Velazquez FR, Matson DO, Guerrero ML, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, et al. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis.* 2000;182(6):1602-9.

115. Crawford SE, Estes MK, Ciarlet M, Barone C, O'Neal CM, Cohen J, et al. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles. *J Virol.* 1999;73(6):4813-22.
116. Coulson BS, Grimwood K, Hudson IL, Barnes GL, Bishop RF. Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *J Clin Microbiol.* 1992;30(7):1678-84.
117. Matson DO, O'Ryan ML, Herrera I, Pickering LK, Estes MK. Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. *J Infect Dis.* 1993;167(3):577-83.
118. Johansen K, Svensson L. Neutralization of rotavirus and recognition of immunologically important epitopes on VP4 and VP7 by human IgA. *Arch Virol.* 1997;142(7):1491-8.
119. Edwards KM. Maternal antibodies and infant immune responses to vaccines. *Vaccine.* 2015;33(47):6469-72.
120. Totterdell BM, Chrystie IL, Banatvala JE. Cord blood and breast-milk antibodies in neonatal rotavirus infection. *Br Med J.* 1980;280(6217):828-30.
121. Turin CG, Ochoa TJ. The Role of Maternal Breast Milk in Preventing Infantile Diarrhea in the Developing World. *Curr Trop Med Rep.* 2014;1(2):97-105.
122. Ward RL, Clemens JD, Knowlton DR, Rao MR, van Loon FP, Huda N, et al. Evidence that protection against rotavirus diarrhea after natural infection is not dependent on serotype-specific neutralizing antibody. *J Infect Dis.* 1992;166(6):1251-7.

123. Johansen K, Granqvist L, Karlen K, Stintzing G, Uhnoo I, Svensson L. Serum IgA immune response to individual rotavirus polypeptides in young children with rotavirus infection. *Arch Virol.* 1994;138(3-4):247-59.
124. Kirkwood CD, Boniface K, Richardson S, Taraporewala ZF, Patton JT, Bishop RF. Non-structural protein NSP2 induces heterotypic antibody responses during primary rotavirus infection and reinfection in children. *J Med Virol.* 2008;80(6):1090-8.
125. Vizzi E, Calvino E, Gonzalez R, Perez-Schael I, Ciarlet M, Kang G, et al. Evaluation of serum antibody responses against the rotavirus nonstructural protein NSP4 in children after rhesus rotavirus tetravalent vaccination or natural infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(10):1157-63.
126. Ray P, Malik J, Singh RK, Bhatnagar S, Bahl R, Kumar R, et al. Rotavirus nonstructural protein NSP4 induces heterotypic antibody responses during natural infection in children. *J Infect Dis.* 2003;187(11):1786-93.
127. Jaimes MC, Rojas OL, Gonzalez AM, Cajiao I, Charpilienne A, Pothier P, et al. Frequencies of virus-specific CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes secreting gamma interferon after acute natural rotavirus infection in children and adults. *J Virol.* 2002;76(10):4741-9.
128. Rojas OL, Gonzalez AM, Gonzalez R, Perez-Schael I, Greenberg HB, Franco MA, et al. Human rotavirus specific T cells: quantification by ELISPOT and expression of homing receptors on CD4+ T cells. *Virology.* 2003;314(2):671-9.
129. Offit PA, Hoffenberg EJ, Santos N, Gouvea V. Rotavirus-specific humoral and cellular immune response after primary, symptomatic infection. *J Infect Dis.* 1993;167(6):1436-40.

130. Wyatt RG, Mebus CA, Yolken RH, Kalica AR, James HD, Jr., Kapikian AZ, et al. Rotaviral immunity in gnotobiotic calves: heterologous resistance to human virus induced by bovine virus. *Science*. 1979;203(4380):548-50.
131. Vesikari T, Isolauri E, Delem A, d'Hondt E, Andre FE, Beards GM, et al. Clinical efficacy of the RIT 4237 live attenuated bovine rotavirus vaccine in infants vaccinated before a rotavirus epidemic. *J Pediatr*. 1985;107(2):189-94.
132. Green KY, Taniguchi K, Mackow ER, Kapikian AZ. Homotypic and heterotypic epitope-specific antibody responses in adult and infant rotavirus vaccinees: implications for vaccine development. *J Infect Dis*. 1990;161(4):667-79.
133. Vesikari T, Karvonen AV, Majuri J, Zeng SQ, Pang XL, Kohberger R, et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of 2 doses of bovine-human (UK) and rhesus-rhesus-human rotavirus reassortant tetravalent vaccines in Finnish children. *J Infect Dis*. 2006;194(3):370-6.
134. Angel J, Steele AD, Franco MA. Correlates of protection for rotavirus vaccines: Possible alternative trial endpoints, opportunities, and challenges. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(12):3659-71.
135. Sinha A, Kanungo S, Kim DR, Manna B, Song M, Park JY, et al. Antibody secreting B cells and plasma antibody response to rotavirus vaccination in infants from Kolkata India. *Heliyon*. 2018;4(1):e00519.
136. Patel NC, Hertel PM, Estes MK, de la Morena M, Petru AM, Noroski LM, et al. Vaccine-acquired rotavirus in infants with severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2010;362(4):314-9.

137. Matthijnssens J, Bilcke J, Ciarlet M, Martella V, Banyai K, Rahman M, et al. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 2009;4(10):1303-16.
138. Patel M, Glass RI, Jiang B, Santosham M, Lopman B, Parashar U. A systematic review of anti-rotavirus serum IgA antibody titer as a potential correlate of rotavirus vaccine efficacy. *J Infect Dis.* 2013;208(2):284-94.
139. Lopman BA, Payne DC, Tate JE, Patel MM, Cortese MM, Parashar UD. Post-licensure experience with rotavirus vaccination in high and middle income countries; 2006 to 2011. *Curr Opin Virol.* 2012;2(4):434-42.
140. Lopman BA, Pitzer VE, Sarkar R, Gladstone B, Patel M, Glasser J, et al. Understanding reduced rotavirus vaccine efficacy in low socio-economic settings. *PLoS One.* 2012;7(8):e41720.
141. Armah GE, Breiman RF, Tapia MD, Dallas MJ, Neuzil KM, Binka FN, et al. Immunogenicity of the pentavalent rotavirus vaccine in African infants. *Vaccine.* 2012;30 Suppl 1:A86-93.
142. Zaman K, Dang DA, Victor JC, Shin S, Yunus M, Dallas MJ, et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2010;376(9741):615-23.
143. Lau YL, Nelson EA, Poon KH, Chan PK, Chiu S, Sung R, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of a human rotavirus vaccine (RIX4414) in Hong Kong children up to three years of age: a randomized, controlled trial. *Vaccine.* 2013;31(18):2253-9.

144. Kawamura N, Tokoeda Y, Oshima M, Okahata H, Tsutsumi H, Van Doorn LJ, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of RIX4414 in Japanese infants during the first two years of life. *Vaccine*. 2011;29(37):6335-41.
145. Herrera D, Vasquez C, Corthesy B, Franco MA, Angel J. Rotavirus specific plasma secretory immunoglobulin in children with acute gastroenteritis and children vaccinated with an attenuated human rotavirus vaccine. *Hum Vaccin Immunother*. 2013;9(11):2409-17.
146. Svensson L, Sheshberadaran H, Vene S, Norrby E, Grandien M, Wadell G. Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. *J Gen Virol*. 1987;68 (Pt 3):643-51.
147. Svensson L, Sheshberadaran H, Vesikari T, Norrby E, Wadell G. Immune response to rotavirus polypeptides after vaccination with heterologous rotavirus vaccines (RIT 4237, RRV-1). *J Gen Virol*. 1987;68 (Pt 7):1993-9.
148. Weitkamp JH, Kallewaard N, Kusuhara K, Bures E, Williams JV, LaFleur B, et al. Infant and adult human B cell responses to rotavirus share common immunodominant variable gene repertoires. *J Immunol*. 2003;171(9):4680-8.
149. Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science*. 1996;272(5258):104-7.
150. Feng N, Lawton JA, Gilbert J, Kuklin N, Vo P, Prasad BV, et al. Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb. *J Clin Invest*. 2002;109(9):1203-13.
151. Thouvenin E, Schoehn G, Rey F, Petitpas I, Mathieu M, Vaney MC, et al. Antibody inhibition of the transcriptase activity of the rotavirus DLP: a structural view. *J Mol Biol*. 2001;307(1):161-72.

152. Aiyegbo MS, Sapparapu G, Spiller BW, Eli IM, Williams DR, Kim R, et al. Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore. *PLoS One*. 2013;8(5):e61101.
153. Yuan L, Geyer A, Hodgins DC, Fan Z, Qian Y, Chang KO, et al. Intranasal administration of 2/6-rotavirus-like particles with mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin (LT-R192G) induces antibody-secreting cell responses but not protective immunity in gnotobiotic pigs. *J Virol*. 2000;74(19):8843-53.
154. Yuan L, Honma S, Ishida S, Yan XY, Kapikian AZ, Hoshino Y. Species-specific but not genotype-specific primary and secondary isotype-specific NSP4 antibody responses in gnotobiotic calves and piglets infected with homologous host bovine (NSP4[A]) or porcine (NSP4[B]) rotavirus. *Virology*. 2004;330(1):92-104.
155. Reeck A, Kavanagh O, Estes MK, Opekun AR, Gilger MA, Graham DY, et al. Serological correlate of protection against norovirus-induced gastroenteritis. *J Infect Dis*. 2010;202(8):1212-8.
156. Hjelt K, Grauballe PC, Schiotz PO, Andersen L, Krasilnikoff PA. Intestinal and serum immune response to a naturally acquired rotavirus gastroenteritis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1985;4(1):60-6.
157. Jaimes MC, Rojas OL, Kunkel EJ, Lazarus NH, Soler D, Butcher EC, et al. Maturation and trafficking markers on rotavirus-specific B cells during acute infection and convalescence in children. *J Virol*. 2004;78(20):10967-76.
158. Rojas OL, Caicedo L, Guzman C, Rodriguez LS, Castaneda J, Uribe L, et al. Evaluation of circulating intestinally committed memory B cells in children

vaccinated with attenuated human rotavirus vaccine. *Viral Immunol.* 2007;20(2):300-11.

159. Franco MA, Greenberg HB. Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology.* 1997;238(2):169-79.

160. Ward RL, Kirkwood CD, Sander DS, Smith VE, Shao M, Bean JA, et al. Reductions in cross-neutralizing antibody responses in infants after attenuation of the human rotavirus vaccine candidate 89-12. *J Infect Dis.* 2006;194(12):1729-36.

161. Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(7):529-39.

162. Parra M, Herrera D, Jacome MF, Mesa MC, Rodriguez LS, Guzman C, et al. Circulating rotavirus-specific T cells have a poor functional profile. *Virology.* 2014;468-470:340-50.

163. Lamichhane A, Azegamia T, Kiyono H. The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine.* 2014;32(49):6711-23.

164. Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* 2010;6(10):e1001067.

165. McGhee JR, Michalek SM, Kiyono H, Eldridge JH, Colwell DE, Williamson SI, et al. Mucosal immunoregulation: environmental lipopolysaccharide and GALT T lymphocytes regulate the IgA response. *Microbiol Immunol.* 1984;28(3):261-80.

166. Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(2):148-58.

167. Owen RL, Jones AL. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology*. 1974;66(2):189-203.
168. Kiyono H, Fukuyama S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(9):699-710.
169. Mora JR, Iwata M, Eksteen B, Song SY, Junt T, Senman B, et al. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science*. 2006;314(5802):1157-60.
170. Corthesy B. Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis. *Autoimmun Rev*. 2013;12(6):661-5.
171. Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol*. 2008;1(1):31-7.
172. Brandtzaeg P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine*. 2007;25(30):5467-84.
173. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol*. 2008;1(1):11-22.
174. Otczyk DC, Cripps AW. Mucosal immunization: a realistic alternative. *Hum Vaccin*. 2010;6(12):978-1006.
175. Blutt SE, Kirkwood CD, Parreno V, Warfield KL, Ciarlet M, Estes MK, et al. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet*. 2003;362(9394):1445-9.
176. Rivero-Calle I, Gomez-Rial J, Martinon-Torres F. Systemic features of rotavirus infection. *J Infect*. 2016;72 Suppl:S98-S105.

177. Gomez-Rial J, Sanchez-Batan S, Rivero-Calle I, Pardo-Seco J, Martinon-Martinez JM, Salas A, et al. Rotavirus infection beyond the gut. *Infect Drug Resist.* 2019;12:55-64.
178. Blutt SE, Matson DO, Crawford SE, Staat MA, Azimi P, Bennett BL, et al. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med.* 2007;4(4):e121.
179. Jonesteller CL, Burnett E, Yen C, Tate JE, Parashar UD. Effectiveness of Rotavirus Vaccination: A Systematic Review of the First Decade of Global Postlicensure Data, 2006-2016. *Clin Infect Dis.* 2017;65(5):840-50.
180. Payne DC, Baggs J, Zerr DM, Klein NP, Yih K, Glanz J, et al. Protective association between rotavirus vaccination and childhood seizures in the year following vaccination in US children. *Clin Infect Dis.* 2014;58(2):173-7.
181. Yeom JS, Kim YS, Kim RB, Park JS, Seo JH, Park E, et al. Impact of rotavirus vaccine introduction on rotavirus-associated seizures and a related possible mechanism. *J Child Neurol.* 2015;30(6):729-34.
182. Pardo-Seco J, Cebey-Lopez M, Martinon-Torres N, Salas A, Gomez-Rial J, Rodriguez-Tenreiro C, et al. Impact of Rotavirus Vaccination on Childhood Hospitalization for Seizures. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34(7):769-73.
183. Salas A, Pardo-Seco J, Cebey-Lopez M, Martinon-Martinez JM, Gomez-Rial J, Curras-Tuala MJ, et al. Impact of rotavirus vaccination on childhood hospitalizations for seizures: Heterologous or unforeseen direct vaccine effects? *Vaccine.* 2019;37(25):3362-8.
184. Park SH, Kim YO, Kim HK, Kim HS, Kim BY, Cheon KR, et al. Incidence of benign convulsions with mild gastroenteritis after introduction of rotavirus vaccine. *Brain Dev.* 2015;37(6):625-30.

185. Sheridan SL, Ware RS, Grimwood K, Lambert SB. Febrile Seizures in the Era of Rotavirus Vaccine. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2016;5(2):206-9.
186. Burke RM, Tate JE, Dahl RM, Aliabadi N, Parashar UD. Rotavirus Vaccination Is Associated With Reduced Seizure Hospitalization Risk Among Commercially Insured US Children. *Clin Infect Dis.* 2018;67(10):1614-6.
187. Kempainen KM, Lynch KF, Liu E, Lonrot M, Simell V, Briesse T, et al. Factors That Increase Risk of Celiac Disease Autoimmunity After a Gastrointestinal Infection in Early Life. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2017;15(5):694-702 e5.
188. Hemming-Harlo M, Lahdeaho ML, Maki M, Vesikari T. Rotavirus Vaccination Does Not Increase Type 1 Diabetes and May Decrease Celiac Disease in Children and Adolescents. *Pediatr Infect Dis J.* 2019;38(5):539-41.
189. Rogers MAM, Basu T, Kim C. Lower Incidence Rate of Type 1 Diabetes after Receipt of the Rotavirus Vaccine in the United States, 2001-2017. *Sci Rep.* 2019;9(1):7727.
190. Perrett KP, Jachno K, Nolan TM, Harrison LC. Association of Rotavirus Vaccination With the Incidence of Type 1 Diabetes in Children. *JAMA Pediatr.* 2019;173(3):280-2.
191. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics.* 2009;25(9):1105-11.
192. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-9.

193. Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rinn JL, Pachter L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol.* 2013;31(1):46-53.
194. Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Web Server issue):W305-11.
195. Risso D, Schwartz K, Sherlock G, Dudoit S. GC-content normalization for RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:480.
196. Gene Ontology C. The Gene Ontology (GO) project in 2006. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):D322-6.
197. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000;25(1):25-9.
198. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D109-14.
199. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS.* 2012;16(5):284-7.
200. Jombart T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics.* 2008;24(11):1403-5.
201. Zuberi K, Franz M, Rodriguez H, Montojo J, Lopes CT, Bader GD, et al. GeneMANIA prediction server 2013 update. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Web Server issue):W115-22.

202. Friedman MG, Entin N, Zedaka R, Dagan R. Subclasses of IgA antibodies in serum and saliva samples of newborns and infants immunized against rotavirus. *Clin Exp Immunol.* 1996;103(2):206-11.
203. Thurm CW, Halsey JF. Measurement of cytokine production using whole blood. *Curr Protoc Immunol.* 2005;Chapter 7:Unit 7 18B.
204. Paredes RM, Tadaki DK, Sooter A, Gamboni F, Sheppard F. Cryopreservation of human whole blood allows immunophenotyping by flow cytometry up to 30days after cell isolation. *J Immunol Methods.* 2018;452:32-8.
205. Friedman MG, Segal B, Zedaka R, Sarov B, Margalith M, Bishop R, et al. Serum and salivary responses to oral tetravalent reassortant rotavirus vaccine in newborns. *Clin Exp Immunol.* 1993;92(2):194-9.
206. Jayashree S, Bhan MK, Kumar R, Raj P, Glass R, Bhandari N. Serum and salivary antibodies as indicators of rotavirus infection in neonates. *J Infect Dis.* 1988;158(5):1117-20.
207. Paul A, Babji S, Sarkar R, Lazarus RP, Kang G. Rotavirus specific Salivary and Fecal IgA in Indian Children and Adults. *Indian Pediatr.* 2016;53(7):601-6.
208. Grimwood K, Lund JC, Coulson BS, Hudson IL, Bishop RF, Barnes GL. Comparison of serum and mucosal antibody responses following severe acute rotavirus gastroenteritis in young children. *J Clin Microbiol.* 1988;26(4):732-8.
209. Aiyar J, Bhan MK, Bhandari N, Kumar R, Raj P, Sazawal S. Rotavirus-specific antibody response in saliva of infants with rotavirus diarrhea. *J Infect Dis.* 1990;162(6):1383-4.
210. Scicchitano R, Sheldrake RF, Husband AJ. Origin of immunoglobulins in respiratory tract secretion and saliva of sheep. *Immunology.* 1986;58(2):315-21.

211. Strober W, Blaes RM, Waldmann TA. The origin of salivary IgA. *J Lab Clin Med.* 1970;75(5):856-62.
212. Brandtzaeg P. Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1098:288-311.
213. Blutt SE, Miller AD, Salmon SL, Metzger DW, Conner ME. IgA is important for clearance and critical for protection from rotavirus infection. *Mucosal Immunol.* 2012;5(6):712-9.
214. Forrest BD. Indirect measurement of intestinal immune responses to an orally administered attenuated bacterial vaccine. *Infect Immun.* 1992;60(5):2023-9.
215. Jertborn M, Svennerholm AM, Holmgren J. Saliva, breast milk, and serum antibody responses as indirect measures of intestinal immunity after oral cholera vaccination or natural disease. *J Clin Microbiol.* 1986;24(2):203-9.
216. Kvistgaard AS, Pallesen LT, Arias CF, Lopez S, Petersen TE, Heegaard CW, et al. Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections. *J Dairy Sci.* 2004;87(12):4088-96.
217. Moon SS, Wang Y, Shane AL, Nguyen T, Ray P, Dennehy P, et al. Inhibitory effect of breast milk on infectivity of live oral rotavirus vaccines. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(10):919-23.
218. Glass RI, Stoll BJ. The protective effect of human milk against diarrhea. A review of studies from Bangladesh. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1989;351:131-6.
219. Ali A, Kazi AM, Cortese MM, Fleming JA, Moon S, Parashar UD, et al. Impact of withholding breastfeeding at the time of vaccination on the immunogenicity of oral rotavirus vaccine--a randomized trial. *PLoS One.* 2015;10(6):e0127622.

220. Lappalainen S, Blazevic V, Malm M, Vesikari T. Rotavirus vaccination and infection induce VP6-specific IgA responses. *J Med Virol.* 2017;89(2):239-45.
221. Blutt SE, Conner ME. The gastrointestinal frontier: IgA and viruses. *Front Immunol.* 2013;4:402.
222. Barnes GK, Workalemahu B, Kristiansen PA, Beyene D, Merdekios B, Fissiha P, et al. Salivary and Serum Antibody Response Against *Neisseria meningitidis* After Vaccination With Conjugate Polysaccharide Vaccines in Ethiopian Volunteers. *Scand J Immunol.* 2016;84(2):118-29.
223. Zhou X, Fragala MS, McElhaney JE, Kuchel GA. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(5):541-7.
224. Janeway CA. *Immunobiology : the immune system in health and disease.* 5th ed. New York: Garland; 2001. XVIII, 732 p. p.
225. Steele C, Fidel PL, Jr. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infect Immun.* 2002;70(2):577-83.
226. Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun.* 1993;61(11):4569-74.
227. Waterhouse CC, Stadnyk AW. Rapid expression of IL-1beta by intestinal epithelial cells in vitro. *Cell Immunol.* 1999;193(1):1-8.
228. Takatori H, Kanno Y, Watford WT, Tato CM, Weiss G, Ivanov, II, et al. Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J Exp Med.* 2009;206(1):35-41.

229. Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *Int Immunol*. 2011;23(3):159-63.
230. Zhang B, Chassaing B, Shi Z, Uchiyama R, Zhang Z, Denning TL, et al. Viral infection. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. *Science*. 2014;346(6211):861-5.
231. Kumar P, Thakar MS, Ouyang W, Malarkannan S. IL-22 from conventional NK cells is epithelial regenerative and inflammation protective during influenza infection. *Mucosal Immunol*. 2013;6(1):69-82.
232. Lindemans CA, Calafiore M, Mertelsmann AM, O'Connor MH, Dudakov JA, Jenq RR, et al. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature*. 2015;528(7583):560-4.
233. Katlinskaya YV, Katlinski KV, Lasri A, Li N, Beiting DP, Durham AC, et al. Type I Interferons Control Proliferation and Function of the Intestinal Epithelium. *Mol Cell Biol*. 2016;36(7):1124-35.
234. Bielenberg DR, Fidler IJ, Bucana CD. Constitutive expression of interferon beta in differentiated epithelial cells exposed to environmental stimuli. *Cancer Biother Radiopharm*. 1998;13(5):375-82.
235. Hsu AC, Parsons K, Barr I, Lowther S, Middleton D, Hansbro PM, et al. Critical role of constitutive type I interferon response in bronchial epithelial cell to influenza infection. *PLoS One*. 2012;7(3):e32947.
236. Sherry B. Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(9):559-67.
237. Arnold MM, Sen A, Greenberg HB, Patton JT. The battle between rotavirus and its host for control of the interferon signaling pathway. *PLoS Pathog*. 2013;9(1):e1003064.

238. Tarnawski AS, Jones MK. The role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in mucosal protection, adaptation to injury, and ulcer healing: involvement of EGF-R signal transduction pathways. *J Clin Gastroenterol.* 1998;27 Suppl 1:S12-20.
239. Zijlstra RT, Odle J, Hall WF, Petschow BW, Gelberg HB, Litov RE. Effect of orally administered epidermal growth factor on intestinal recovery of neonatal pigs infected with rotavirus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1994;19(4):382-90.
240. Geng Y, Li J, Wang F, Li Q, Wang X, Sun L, et al. Epidermal growth factor promotes proliferation and improves restoration after intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Inflammation.* 2013;36(3):670-9.
241. Jung K, Kang BK, Kim JY, Shin KS, Lee CS, Song DS. Effects of epidermal growth factor on atrophic enteritis in piglets induced by experimental porcine epidemic diarrhoea virus. *Vet J.* 2008;177(2):231-5.
242. Gessani S, Belardelli F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9(2):117-23.
243. Jiang B, Snipes-Magaldi L, Dennehy P, Keyserling H, Holman RC, Bresee J, et al. Cytokines as mediators for or effectors against rotavirus disease in children. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(6):995-1001.
244. Aslan A, Kurugol Z, Cetin H, Karakasllilar S, Koturoglu G. Comparison of Vesikari and Clark scales regarding the definition of severe rotavirus gastroenteritis in children. *Infect Dis (Lond).* 2015;47(5):332-7.
245. Williamson S, Munro C, Pickler R, Grap MJ, Elswick RK, Jr. Comparison of biomarkers in blood and saliva in healthy adults. *Nurs Res Pract.* 2012;2012:246178.

246. Byrne ML, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, Walsh KA, Laughton K, Waloszek JM, et al. Acute phase protein and cytokine levels in serum and saliva: a comparison of detectable levels and correlations in a depressed and healthy adolescent sample. *Brain Behav Immun.* 2013;34:164-75.
247. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science.* 1994;264(5161):965-8.
248. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med.* 1994;180(4):1395-403.
249. Villena J, Vizoso-Pinto MG, Kitazawa H. Intestinal Innate Antiviral Immunity and Immunobiotics: Beneficial Effects against Rotavirus Infection. *Front Immunol.* 2016;7:563.
250. Janeway CA. *Immunobiology the immune system in health and disease.* 7th ed ed. London etc.: Current Biology Limited etc.; 2008. XXI, 887 p. p.
251. Alsharifi M, Regner M, Blanden R, Lobigs M, Lee E, Koskinen A, et al. Exhaustion of type I interferon response following an acute viral infection. *J Immunol.* 2006;177(5):3235-41.
252. Soni B, Singh S. Cytokine Milieu in Infectious Disease: A Sword or a Boon? *J Interferon Cytokine Res.* 2020;40(1):24-32.
253. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.
254. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008;180(9):5771-7.

255. Roncarolo MG, Battaglia M, Gregori S. The role of interleukin 10 in the control of autoimmunity. *J Autoimmun.* 2003;20(4):269-72.
256. Gonzalez A, Sahaza JH, Ortiz BL, Restrepo A, Cano LE. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Med Mycol.* 2003;41(5):391-9.
257. Al-Banna N, Raghupathy R, Albert MJ. Correlation of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine levels with histopathological changes in an adult mouse lung model of *Campylobacter jejuni* infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15(12):1780-7.
258. Lampropoulou V, Shen P, Hilgenberg E, Ries S, Opitz C, Fillatreau S. Functional interactions between B lymphocytes and the innate immune system. *Infect Disord Drug Targets.* 2012;12(3):191-9.
259. Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi CF, Cheng J, Sher A, et al. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science.* 2002;298(5598):1630-4.
260. Hu XD, Chen ST, Li JY, Yu DH, Yi Z, Cai H. An IL-15 adjuvant enhances the efficacy of a combined DNA vaccine against *Brucella* by increasing the CD8+ cytotoxic T cell response. *Vaccine.* 2010;28(12):2408-15.
261. Oh S, Berzofsky JA, Burke DS, Waldmann TA, Perera LP. Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(6):3392-7.
262. Tovey MG, Lallemand C. Adjuvant activity of cytokines. *Methods Mol Biol.* 2010;626:287-309.

263. Teodorczyk-Injeyan JA, Cembrzynska-Nowak M, Lalani S, Rizoli S, Taylor G. Tumor necrosis factor alpha regulation of immunoglobulin secretion in trauma patients. *Circ Shock*. 1994;43(1):26-33.
264. Naude PJ, den Boer JA, Luiten PG, Eisel UL. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J*. 2011;278(6):888-98.
265. Johansen K, Hinkula J, Espinoza F, Levi M, Zeng C, Ruden U, et al. Humoral and cell-mediated immune responses in humans to the NSP4 enterotoxin of rotavirus. *J Med Virol*. 1999;59(3):369-77.
266. Yuan L, Ishida S, Honma S, Patton JT, Hodgins DC, Kapikian AZ, et al. Homotypic and heterotypic serum isotype-specific antibody responses to rotavirus nonstructural protein 4 and viral protein (VP) 4, VP6, and VP7 in infants who received selected live oral rotavirus vaccines. *J Infect Dis*. 2004;189(10):1833-45.
267. Didsbury A, Wang C, Verdon D, Sewell MA, McIntosh JD, Taylor JA. Rotavirus NSP4 is secreted from infected cells as an oligomeric lipoprotein and binds to glycosaminoglycans on the surface of non-infected cells. *Virology*. 2011;8:551.
268. Kattoura MD, Chen X, Patton JT. The rotavirus RNA-binding protein NS35 (NSP2) forms 10S multimers and interacts with the viral RNA polymerase. *Virology*. 1994;202(2):803-13.
269. Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol*. 1998;35(6):461-78.
270. Eichwald C, Arnoldi F, Laimbacher AS, Schraner EM, Fraefel C, Wild P, et al. Rotavirus viroplasm fusion and perinuclear localization are dynamic processes requiring stabilized microtubules. *PLoS One*. 2012;7(10):e47947.

271. Bhowmick R, Banik G, Chanda S, Chattopadhyay S, Chawla-Sarkar M. Rotavirus infection induces G1 to S phase transition in MA104 cells via Ca⁽⁺⁾(2)/Calmodulin pathway. *Virology*. 2014;454-455:270-9.
272. Gjermansen IM, Justesen J, Martensen PM. The interferon-induced gene ISG12 is regulated by various cytokines as the gene 6-16 in human cell lines. *Cytokine*. 2000;12(3):233-8.
273. Rasmussen UB, Wolf C, Mattei MG, Chenard MP, Bellocq JP, Chambon P, et al. Identification of a new interferon-alpha-inducible gene (p27) on human chromosome 14q32 and its expression in breast carcinoma. *Cancer Res*. 1993;53(17):4096-101.
274. Hsieh WL, Huang YH, Wang TM, Ming YC, Tsai CN, Pang JH. IFI27, a novel epidermal growth factor-stabilized protein, is functionally involved in proliferation and cell cycling of human epidermal keratinocytes. *Cell Prolif*. 2015;48(2):187-97.
275. Herberg JA, Kaforou M, Gormley S, Sumner ER, Patel S, Jones KD, et al. Transcriptomic profiling in childhood H1N1/09 influenza reveals reduced expression of protein synthesis genes. *J Infect Dis*. 2013;208(10):1664-8.
276. Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*. 2008;89(Pt 1):1-47.
277. Sanchez G, Aragonés L, Costafreda MI, Ribes E, Bosch A, Pinto RM. Capsid region involved in hepatitis A virus binding to glycoporphin A of the erythrocyte membrane. *J Virol*. 2004;78(18):9807-13.
278. Thacker TC, Johnson FB. Binding of bovine parvovirus to erythrocyte membrane sialylglycoproteins. *J Gen Virol*. 1998;79 (Pt 9):2163-9.

279. Wybenga LE, Epand RF, Nir S, Chu JW, Sharom FJ, Flanagan TD, et al. Glycophorin as a receptor for Sendai virus. *Biochemistry*. 1996;35(29):9513-8.
280. Ohyama K, Endo T, Ohkuma S, Yamakawa T. Isolation and influenza virus receptor activity of glycophorins B, C and D from human erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1148(1):133-8.
281. Paul RW, Lee PW. Glycophorin is the reovirus receptor on human erythrocytes. *Virology*. 1987;159(1):94-101.
282. Svensson L. Group C rotavirus requires sialic acid for erythrocyte and cell receptor binding. *J Virol*. 1992;66(9):5582-5.
283. Winzeler EA. Glycophorin alleles link to malaria protection. *Science*. 2017;356(6343):1122-3.
284. Baum J, Ward RH, Conway DJ. Natural selection on the erythrocyte surface. *Mol Biol Evol*. 2002;19(3):223-9.
285. Gagneux P, Varki A. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology*. 1999;9(8):747-55.
286. Isa P, Lopez S, Segovia L, Arias CF. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J Virol*. 1997;71(9):6749-56.
287. Sethi SK, Bianco A, Allen JT, Knight RA, Spiteri MA. Interferon-gamma (IFN-gamma) down-regulates the rhinovirus-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human airway epithelial cells. *Clin Exp Immunol*. 1997;110(3):362-9.
288. Ermert D, Blom AM. C4b-binding protein: The good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend. *Immunol Lett*. 2016;169:82-92.

289. Rodel J, Lehmann M, Vogelsang H, Straube E. Chlamydia pneumoniae infection of aortic smooth muscle cells reduces platelet-derived growth factor receptor-beta expression. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;51(2):363-71.
290. Versteeg GA, Rajsbaum R, Sanchez-Aparicio MT, Maestre AM, Valdiviezo J, Shi M, et al. The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors. *Immunity.* 2013;38(2):384-98.
291. Eyking A, Ferber F, Kohler S, Reis H, Cario E. TRIM58 Restrains Intestinal Mucosal Inflammation by Negatively Regulating TLR2 in Myeloid Cells. *J Immunol.* 2019;203(6):1636-49.
292. Beaulieu AM, Madera S, Sun JC. Molecular Programming of Immunological Memory in Natural Killer Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2015;850:81-91.
293. Beaulieu AM, Zawislak CL, Nakayama T, Sun JC. The transcription factor Zbtb32 controls the proliferative burst of virus-specific natural killer cells responding to infection. *Nat Immunol.* 2014;15(6):546-53.
294. Kuo HH, Ahmad R, Lee GQ, Gao C, Chen HR, Ouyang Z, et al. Anti-apoptotic Protein BIRC5 Maintains Survival of HIV-1-Infected CD4(+) T Cells. *Immunity.* 2018;48(6):1183-94 e5.
295. Hallen LC, Burki Y, Ebeling M, Broger C, Siegrist F, Oroszlan-Szovik K, et al. Antiproliferative activity of the human IFN-alpha-inducible protein IFI44. *J Interferon Cytokine Res.* 2007;27(8):675-80.
296. Hystad ME, Myklebust JH, Bo TH, Sivertsen EA, Rian E, Forfang L, et al. Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling. *J Immunol.* 2007;179(6):3662-71.

297. Rosenbaum M, Andreani V, Kapoor T, Herp S, Flach H, Duchniewicz M, et al. MZB1 is a GRP94 cochaperone that enables proper immunoglobulin heavy chain biosynthesis upon ER stress. *Genes Dev.* 2014;28(11):1165-78.
298. Laabi Y, Gras MP, Carbonnel F, Brouet JC, Berger R, Larsen CJ, et al. A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma. *EMBO J.* 1992;11(11):3897-904.
299. Mackay F, Schneider P. TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(3-4):263-76.
300. Kuriakose T, Kanneganti TD. ZBP1: Innate Sensor Regulating Cell Death and Inflammation. *Trends Immunol.* 2018;39(2):123-34.
301. Rothenburg S, Schwartz T, Koch-Nolte F, Haag F. Complex regulation of the human gene for the Z-DNA binding protein DLM-1. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(4):993-1000.
302. Yasukawa M, Nakagomi O, Kobayashi Y. Rotavirus induces proliferative response and augments non-specific cytotoxic activity of lymphocytes in humans. *Clin Exp Immunol.* 1990;80(1):49-55.