



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación del TGF-beta durante la infección por rotavirus heterólogo en un modelo múrido neonatal de inhibición de la citocina con Galunisertib

José Angel Gil Perdomo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá D.C, Colombia

2019

Evaluación del TGF-beta durante la infección por rotavirus heterólogo en un modelo murino neonatal de inhibición de la citocina con Galunisertib

José Angel Gil Perdomo

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Farmacología

Director:

Ph.D. Manuel Antonio Franco Cortés

Codirectora:

Ph.D. Lucy Gabriela Delgado Murcia

Línea de Investigación:

Inmunogenética e inmunomodulación

Grupo de Investigación:

Instituto de Genética Humana (Pontificia Universidad Javeriana)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2019

*«Nihil te turbet, nihil te terreat,
omnia transeunt, Deus non mutatur,
patientia omnia obtinet;
ei qui Deum habet nihil deest:
Deus solus sufficit».*
(sanctae Theresiae a Iesu)

Agradecimientos

A Dios, por darme todas las gracias necesarias para llevar a cabo este proyecto.

A mi familia y amigos, por todo su apoyo moral, afectivo y económico.

Al Dr. Franco, a la Dra. Juanita y a la Dra. Luz Stella por todas sus enseñanzas, por la gratuidad y paciencia como lo han hecho, por el tiempo y energía dedicado a mi aprendizaje, por sus consejos, por sus ejemplos, por todo el apoyo que me brindaron desde el primer momento. De verdad, muchísimas gracias.

A la Dra. Gabriela Delgado por aceptar el rol de codirectora en este proyecto y por toda su paciencia y apoyo.

A mis compañeras del laboratorio Laura Rey y Diana Bautista por los apoyos y enseñanzas que recibí durante la realización de algunos experimentos.

A Paola Ayala y a Wilson Terán por el asesoramiento científico en PCR en tiempo real.

A Manuel Góngora, María Lucía, Lorena y Dora y a todo el personal de la Unidad de Biología Comparativa (UBC) de la Universidad Javeriana, por la excelente atención y cuidado de los animales.

A la Dra. Nelly Roa, a Jean Carlos y a todo el personal del Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO) de la Universidad Javeriana por permitirme realizar algunos experimentos en sus instalaciones.

A José Mateus, del Laboratorio de Parasitología Molecular de la Universidad Javeriana, por su ayuda en la prestación de reactivos y del laboratorio.

Al Dr. Miguel Parra, de la Universidad de los Andes, por permitirme realizar algunos pasos de purificación del virus en su laboratorio.

A todo el personal del Instituto de Genética Humana de la Universidad Javeriana.

A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Javeriana por el apoyo financiero.

A los profesores de Seminario II y III del programa de la maestría en Farmacología por todas sus sugerencias en el trabajo de grado.

Al Departamento de Farmacia y a la Universidad Nacional de Colombia por admitirme e incluirme en esta gran escuela de formación.

Resumen

El Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β) es una citocina que, dependiendo del medio al que es expuesta, puede tener funciones pro o antiinflamatorias. En el ambiente intestinal, esta citocina favorece un ambiente tolerogénico frente a los alimentos y microorganismos comensales. Se ha visto, en estudios *in vitro*, que el rotavirus induce esta citocina y que la función reguladora de la citocina podría ser usada por el rotavirus, en su sitio de replicación en el intestino, como un mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria. Usando un modelo murino neonatal de infección por rotavirus heterólogo de simio (RRV), se demostró que una dosis de 10^7 UFF/mL y, en menor medida, una dosis de 10^6 UFF/mL del virus indujo el ARNm de *tgfb1* en el intestino, pero no a nivel sistémico. Sin embargo, la inhibición del receptor 1 de la citocina con Galunisertib (un nuevo inhibidor con efecto directo en el intestino) no modificó la diarrea inducida por la infección. Se encontró que, en el contexto de una infección por rotavirus, el diluyente del Galunisertib tuvo un efecto sobre la pérdida de la ganancia de peso de los animales. Y que, contrario a lo esperado, la expresión de ARNm de *tgfb1* (y de otros genes modulados por la citocina) parecen disminuir en los animales que recibieron el diluyente. Con el desarrollo de este proyecto se apoya la hipótesis de que el rotavirus induce TGF β *in vivo*. Se deben realizar más experimentos, especialmente en los días tempranos posinfección para entender mejor este efecto.

Palabras clave: TGF β 1, Galunisertib, rotavirus heterólogo de simio, ratones neonatos, RT-qPCR

Abstract

Transforming Growth Factor β (TGF β) is a cytokine that, depending on the medium to which it is exposed, can have pro- or anti-inflammatory functions. In the intestinal environment this cytokine favors a tolerogenic environment to food and commensal microorganisms. *In vitro* studies, it has been seen that rotavirus induces TGF β and have suggested that the regulatory function of the cytokine could be used by the rotavirus, in its site of replication in the intestine, as a mechanism of evasion of the immune response. Using a neonatal mouse model of heterologous Rhesus rotavirus (RRV) infection, it was demonstrated that a dose of 10^7 FFU/mL and to a lower extent a dose of 10^6 FFU/mL of the virus induced *tgf β 1* mRNA in the intestine, but not at a systemic level. However, inhibition of cytokine receptor 1 with Galunisertib (a new inhibitor with direct effect on the intestine) did not modify the diarrhea induced by the infection. It was found that, in the context of a rotavirus infection, the diluent of Galunisertib influenced the loss of weight gain of the animals. And unexpected, mRNA expression of *tgf β 1* (and other genes modulated by the cytokine) seems to decrease in the animals that received the diluent. Thus, project supports the hypothesis that rotavirus induces TGF β *in vivo*. More experiments must be carried out especially in the early timepoints post-infection days to clarify this effect.

Keywords: TGF β 1, Galunisertib, heterologous rhesus rotavirus, neonatal mice, RT-qPCR.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de abreviaturas y términos	XV
Introducción	1
1. Estado del Arte	3
1.1 Epidemiología y Estructura del Rotavirus.....	3
1.2 Estructura, activación y señalización del TGF β	4
1.3 Importancia del TGF β en la respuesta inmunitaria	6
1.4 Galunisertib: Un importante inhibidor de la vía de señalización del receptor I del TGF β	7
2. Justificación y Planteamiento del Problema	11
2.1 Estudios <i>in vitro</i> del TGF β en la respuesta inmune contra rotavirus.....	11
2.2 Inhibidores del TGF β usados en el estudio de la inmunidad contra rotavirus.	12
3. Objetivos	15
3.1 Objetivo General.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4. Metodología	17
4.1 Evaluación de los niveles de expresión de ARNm y de producción de TGF β en animales infectados con RRV.....	17
4.1.1 Producción de virus.....	18
4.1.2 Animales	18
4.1.3 Medición de TGF β mediante ELISA	18
4.1.4 Medición de TGF β mediante RT-qPCR.....	19
4.2 Evaluación de los efectos del Galunisertib sobre la diarrea en animales infectados con RRV.....	20
4.2.1 Determinación de la dosis de Galunisertib	20
4.2.2 Esquema de Tratamiento	21
4.3 Evaluación de los niveles de expresión de ARNm y de producción de TGF β en animales infectados con RRV y tratados o no con Galunisertib.....	23
4.3.1 Medición de ARNm <i>tgfb1</i> , <i>serpine1</i> e <i>il11</i> mediante RT-qPCR.....	23
4.3.2 Análisis Estadístico	24

5. Resultados	25
5.1 Evaluación de los niveles de expresión de ARNm y de producción de TGF β en animales infectados con RRV	25
5.2 Efectos del Galunisertib sobre la diarrea en animales infectados con RRV ...	28
5.3 Evaluación de los niveles de expresión de ARNm y de producción de TGF β en animales infectados con RRV y tratados o no con Galunisertib	33
6. Discusión, Conclusiones y Recomendaciones	37
6.1 Conclusiones.....	42
6.2 Recomendaciones.....	43
A. Anexo: Diagrama de flujo de experimentos realizados	45
B. Anexo: Protocolo de semipurificación de RRV por colchón de sacarosa	49
C. Anexo: Protocolo de cuantificación de RRV por inmunocitotinción	51
D. Anexo: Protocolo de ELISA tipo sandwich de TGFβ1	55
E. Anexo: Preparación y cálculos de dosis de Galunisertib	59
F. Anexo: Aprobación por parte del comité de Bioética	67
G. Anexo: Aprobación por parte del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio-PUJ	69
H. Anexo: Aprobación de Financiación del Proyecto	71
I. Anexo: Artículo aceptado en Journal of Virology	75
Bibliografía	77

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Estructura, síntesis y procesamiento del TGF β para la formación del pequeño complejo de latencia.....	5
Figura 5-1: Niveles de ARNm de <i>tgfβ1</i> a distintos puntos de tiempo luego de la infección con RRV.....	26
Figura 5-2: Niveles de TGF β 1 en suero y contenido intestinal a distintos puntos de tiempo luego de la infección con RRV.....	27
Figura 5-3: Curva de sobrevivencia de cada grupo a los distintos puntos de tiempo evaluados.....	28
Figura 5-4: Cinética de crecimiento de animales infectados o no con RRV y tratados con Galunisertib o diluyente	30
Figura 5-5: Frecuencia e Intensidad de la diarrea en animales tratados con Galunisertib	31
Figura 5-6: Niveles de ARNm de <i>tgfβ1</i> , <i>serpine</i> e <i>il11</i> a distintos puntos de tiempo luego de la infección con RRV en animales tratados o no con Galunisertib	33
Figura 5-7: Niveles de TGF β 1 en suero y contenido intestinal a distintos puntos de tiempo luego de la infección con RRV en animales tratados o no con Galunisertib	35

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 4-1: Esquema general del experimento de infección con RRV.....	17
Tabla 4-2: Esquema de inhibición de Galunisertib en ratones C57BL/6.....	20
Tabla 4-3: Evaluación cuantitativa de la severidad de la diarrea en ratones C57BL/6	21
Tabla 4-4: Esquema general del experimento de inhibición con Galunisertib en ratones vacunados o no con RRV	22

Lista de abreviaturas y términos

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>ADNc</i>	ADN complementario
<i>ALK5</i>	Receptor de tipo I para TGF β
<i>ALK5i</i>	Inhibidor del Receptor de I para TGF β
<i>ARNm</i>	ARN mensajero
<i>C57BL/6</i>	Cepa endogámica de pelaje marrón oscuro usada en laboratorio
<i>CEI</i>	Células Epiteliales de Intestino
<i>CMC</i>	Carboximetilcelulosa
<i>DIL</i>	Diluyente del Galunisertib
<i>DMSO</i>	Dimetilsulfóxido
<i>dsARN</i>	ARN bicatenario sin envoltura
<i>ELISA</i>	Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas
<i>FAM</i>	Fluoróforo de carboxifluoresceína
<i>FHD</i>	Primera dosis en humanos
<i>GAL</i>	Galunisertib
<i>GAPDH</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<i>GATA3</i>	Factor de transcripción maestro Th2
<i>GZMB</i>	Granzima B
<i>HCC</i>	Carcinoma Hepatocelular
<i>HCl</i>	Ácido Clorhídrico
<i>HEC</i>	Hidroxietilcelulosa
<i>IC50</i>	Concentración inhibitoria media
<i>IFN</i>	Interferón
<i>IgA</i>	Inmunoglobulina A
<i>LAP</i>	Péptido Asociado a Latencia
<i>MA104</i>	Línea celular de tejido de riñón de mono verde africano
<i>Mock</i>	Sobrenadante donde se cultiva el RRV
<i>NSP</i>	Proteína No Estructural
<i>PAI-1</i>	Glicoproteína inhibidora del activador de plasminógeno 1
<i>PGE</i>	Prostaglandina E
<i>PVP</i>	Polivinilpirrolidona
<i>RNAlater</i>	Solución para preservar y proteger el ARN de la degradación
<i>RRV</i>	<i>Rhesus RotaVirus</i>
<i>RT-qPCR</i>	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real
<i>SER</i>	Elementos de respuesta de SMAD
<i>SLC</i>	Pequeño Complejo de Latencia
<i>SLS</i>	Lauril Sulfato Sódico

Abreviatura	Término
SMAD	Familia de factores de transcripción
SMI	Inhibidor de moléculas pequeñas
SNC	Sistema Nervioso Central
T-bet	Factor de transcripción maestro Th1
TGFβ	Factor de Crecimiento Transformante Beta
TGFβRI	Receptor de tipo I para TGFβ
TGFβRII	Receptor de tipo II para TGFβ
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
Trizol	Solución de Fenol e Tiocianato de guanidinio
TSLP	Linfopoyetina estromal tímica
TSP-1	Trombospondina-1
UFF	Unidades Formadoras de Focos
UPL	Librería de Sondas Universales
VP	Proteína Viral

Términos

Término	Definición
<i>Anticuerpo neutralizante</i>	Anticuerpos que se unen al virus, evitan que infecte las células y causan un cambio conformacional en este (Owen, Punt, Stranford, & Jones, 2015) (Paul, 2008).
<i>Calidad de la Respuesta T</i>	Representa las características de células T eficientes, es decir, con habilidades para proliferar, inducir la proliferación de otras células, organizar la respuesta inmune y llevar a cabo funciones efectoras a través de mecanismos citolíticos o la secreción de citocinas (Parra Avila, Ángel Uribe, & Franco, 2014)
<i>Carboximetilcelulosa</i>	Es un derivado de celulosa (polímero de beta-(1,4)-D glucopiranos) que ayuda a modificar y estabilizar la viscosidad de una emulsión (De Santis, Fabris, Fontani, Taccani, & Zorzetto, 1970)
<i>Células Dendríticas (DCs)</i>	Células derivadas de la médula ósea que se encuentran en la mayoría de los tejidos, incluidos los tejidos linfoides, y que forman parte de un subconjunto altamente especializado de células presentadoras de antígenos profesionales, que desempeñan un papel central en el inicio de la inmunidad innata y adaptativa (Murphy, 2012)
<i>Citocinas pro-inflamatorias</i>	Mediadores positivos de la inflamación que, en una amplia variedad de infecciones, se liberan como respuesta del huésped debido a la activación del inflammasoma. Estas citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN-γ, IL-18 y el propio TNF) sirven para contener y resolver los focos inflamatorios mediante la activación de respuestas inflamatorias locales y sistémicas (Srinivasan, Harris, & Kilpatrick, 2016) (Chakraborty, Bhattacharyya, & Banerjee, 2017)
<i>Cuantificación Relativa</i>	Un ensayo para analizar los cambios en la expresión génica en una muestra dada en relación con otra muestra de referencia (Schmittgen, 2006).
<i>Diarrea aguda</i>	Aparición repentina de un aumento del contenido de líquido en las heces por encima del valor normal de 10 ml/kg/día. En términos

Término	Definición
	prácticos, se asocia con una mayor frecuencia y consistencia de líquidos en las heces (Dalby-Payne & Elliott, 2002).
<i>Diarrea malabsortiva</i>	Es debida a la destrucción mediada por el virus de los enterocitos absortivos, la disminución de la expresión de las enzimas absortivas inducida por el virus y los cambios funcionales en las uniones estrechas entre los enterocitos (Greenberg & Estes, 2009).
<i>Diarrea osmótica</i>	Es debido a la mala absorción, la cual es secundaria al daño o muerte del enterocito, o a la disminución de la función de absorción intestinal (Crawford et al., 2017).
<i>Eficiencia de la reacción PCR</i>	Proporción del número de moléculas del gen diana al final de un ciclo de PCR dividida por la cantidad de moléculas diana al inicio del mismo ciclo de la PCR. Esta debe ser del 90 al 100%, lo que significa duplicar el amplicón en cada ciclo (Schmittgen, 2006).
<i>ELISA tipo sándwich</i>	Esta variante usa un par de anticuerpos específicos para una parte (epítotope) diferente y no superpuesta de la molécula de antígeno. Un primer anticuerpo (conocido como anticuerpo de captura) se adhiere a los pozos, luego se agrega la solución de muestra al pozo y un segundo anticuerpo (conocido como anticuerpo de detección) sigue este paso para medir la concentración de la muestra (Owen et al., 2015) (Boster Biological Technology, 2019).
<i>Enterocito maduro</i>	Células epiteliales del intestino que ya han alcanzado un estado de diferenciación y desarrollo final que se caracteriza por su ubicación hacia las vellosidades intestinales, por su capacidad absortiva y por la expresión de proteínas y enzimas transportadoras (Pathophysiology Vivo, 2014).
<i>Factor de Crecimiento Transformante-beta (TGFβ)</i>	Miembro de una subfamilia de citocinas que en mamíferos comprende tres isoformas distintas: TGFβ1, TGFβ2, y TGFβ3. Es producido por un gran número de células inmunitarias y en particular por linfocitos, macrófagos y células dendríticas y, dependiendo del medio al que es expuesto, puede tener funciones pro o antiinflamatorias (Travis & Sheppard, 2014).
<i>Galunisertib</i>	Es el primer inhibidor de moléculas pequeñas (SMIs, del inglés, <i>small-molecule inhibitor</i>) biodisponible por vía oral que actúa sobre la vía de señalización mediada por quinasas de serina/treonina del receptor de TGFβ de tipo I (ALK5), específicamente regulando negativamente la fosforilación de SMAD2, aboliendo la activación de la vía clásica de señalización del TGFβ (Herbertz et al., 2015) (Melisi et al., 2018).
<i>Gastroenteritis</i>	Inflamación de la mucosa gástrica e intestinal, regularmente de causa infecciosa, que va a cursar clínicamente con un cuadro de deposiciones líquidas en número aumentado que suele acompañarse de vómitos, fiebre y dolor abdominal (De Miguel Durán & Perdomo Giraldi, 2011).
<i>Gen de referencia (housekeeping gen)</i>	Genes que se expresan ampliamente en abundancia y se usan como genes de referencia para la normalización en la PCR en tiempo real con el supuesto de "expresión constante" (Schmittgen, 2006).
<i>Inmunoglobulina A intestinal</i>	Anticuerpo dimerico secretado por células B del intestino que proporciona protección inmune a la mucosa intestinal como resultado de su capacidad para interactuar con el receptor de Ig polimérico

Término	Definición
	(pIgR), un transportador de anticuerpos expresado en la superficie basolateral de las células epiteliales (Cerutti & Rescigno, 2008).
<i>Integrina</i>	Proteínas heterodiméricas de la superficie celular implicadas en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Son importantes en las interacciones adhesivas entre los linfocitos y las células presentadoras de antígenos y en la adherencia de los linfocitos y los leucocitos a las paredes de los vasos sanguíneos y la migración a los tejidos (Murphy, 2012).
<i>Interferon beta (IFN-β)</i>	Citocina de la clase de Interferones de tipo I secretada por células dendríticas, macrófagos y células infectadas por virus. Induce un estado antiviral en la mayoría de las células nucleadas; aumenta la expresión moléculas MHC Clase I y activa células NK (<i>Natural Killer</i>) (Owen et al., 2015).
<i>Interferon gamma (IFN-γ)</i>	Citocina de la clase de Interferones de tipo II secretada por células Th1, células CD8+ y células NK, que activa macrófagos, con la consiguiente destrucción de patógenos intracelulares (Owen et al., 2015).
<i>Interleucina-11 (IL-11)</i>	Citocina de unión a GP130, una glicoproteína importante para la señalización mediada por STAT3 en el inicio de la metástasis por células estromales estimuladas por TGFβ (Calon et al., 2012).
<i>Interleucina-2 (IL-2)</i>	Citocina que funciona como factor de proliferación autocrino que es esencial para promover la proliferación de células T y la diferenciación hacia células efectoras o de memoria (Owen et al., 2015).
<i>Lauril Sulfato Sódico (SLS)</i>	Detergente aniónico usado como agente emulsificante y solubilizante de medicamentos (Medicines Agency, 2015).
<i>Linfocitos T CD4</i>	Son células T α/β que expresan el correceptor CD4, y son las principales células ayudadoras (Th, <i>T helper</i>) del sistema inmunitario encargadas de coordinar la acción efectora de los diferentes tipos celulares (Paul, 2008).
<i>Linfocitos T CD8</i>	Son células T α/β que expresan el correceptor CD8, que se diferencian en linfocitos T citotóxicos (CTL) capaces de lisar eficazmente las células diana que expresan antígenos reconocidos por los CTL (Paul, 2008).
<i>Linfocitos T reguladores (T regs)</i>	Un tipo de célula T CD4 que regula negativamente las respuestas inmunes. Se define por la expresión del regulador maestro FoxP3 y se presenta en dos versiones, las Tregs inducidas (iTregs) que se desarrollan a partir de células T maduras en la periferia, y Treg naturales (nTregs), que se desarrollan a partir de células T inmaduras en el timo (Murphy, 2012).
<i>Método Pfaffl</i>	Un método que permite corregir la eficiencia de las curvas de la reacción de PCR normalizando controles (gen de referencia y gen de interés) contra muestras (Pfaffl, 2001).
<i>Normalización</i>	Un gen de control que se expresa a un nivel constante se usa para normalizar los resultados de la expresión génica para la cantidad de plantilla variable o la calidad de la plantilla (Schmittgen, 2006).
<i>PCR en tiempo real (RT-qPCR)</i>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real que permite recolección continua de señales fluorescentes de una o más

Término	Definición
	reacciones en cadena de la polimerasa en un rango de ciclos. Esto para luego hacer la conversión de las señales fluorescentes de cada reacción en un valor numérico para cada muestra (Schmittgen, 2006).
<i>Polivinilpirrolidona (PVP)</i>	Es un polímero de vinilpirrolidona, higroscópico, amorfo y soluble en agua y en solventes orgánicos (Ashland, 2013). Este compuesto es uno de los tres principales excipientes farmacéuticos nuevos que puede usarse como codisolvente (Chemical Book, 2017).
<i>Prostaglandina E2 (PGE2)</i>	Un lípido bioactivo del ácido araquidónico que provoca una amplia gama de efectos biológicos asociados con la inflamación y el cáncer. Ejerce diversos efectos sobre la proliferación celular, apoptosis, angiogénesis, inflamación y vigilancia inmunológica (Nakanishi & Rosenberg, 2013).
<i>Proteína No Estructural 4 (NSP4)</i>	Proteína no estructural codificada por el segmento 10 del genoma del rotavirus, que funciona para regular la homeostasis del calcio, la replicación del virus y como una enterotoxina (Greenberg & Estes, 2009).
<i>Proteína Viral 4 (VP4)</i>	Proteína estructural codificada por el segmento 4 del genoma del rotavirus, que forma picos o espículas en la superficie del virión. Es la proteína de unión viral, un determinante del crecimiento viral y un factor de virulencia. El tratamiento con tripsina del virus divide VP4 en proteínas VP8 y VP5 (McNeal & Bernstein, 2014).
<i>Proteína Viral 6 (VP6)</i>	Proteína estructural codificada por el segmento 6 del genoma del rotavirus. Es la principal proteína estructural de la cápside viral interna (capa viral media), además, es la proteína viral más inmunogénica. Los anticuerpos contra VP6 no son neutralizantes pero inducen inmunidad protectora en algunos modelos animales (McNeal & Bernstein, 2014) (Blutt et al., 2004).
<i>Proteína Viral 7 (VP7)</i>	Proteína estructural codificada por el segmento 7, 8 o 9 del genoma del rotavirus. Es el constituyente principal de la capa externa de rotavirus y objetivo de los anticuerpos neutralizantes (McNeal & Bernstein, 2014).
<i>Rotavirus de Simio (RRV)</i>	Del inglés, <i>Rhesus rotavirus</i> . Un rotavirus de simio que es idéntico serotípicamente a las cepas de rotavirus humano tipo 3 (G3P[3]) (Mackow et al., 1988) y que ha sido usado como cepa vacunal en humanos (Midthun et al., 1985).
<i>Rotavirus</i>	Son virus de ARN bicatenario sin envoltura (dsARN) que tienen una arquitectura compleja con un genoma de 11 segmentos rodeado por una cápside proteica de tres capas (Crawford et al., 2017)
<i>Serpine1</i>	Gen que codifica para la glicoproteína inhibidora del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) que regula la formación de plasminógeno a plasmina, lo que favorece la invasión de células cancerosas al degradar la matriz extracelular (Mazzocchi et al., 2012) (Calon et al., 2012).
<i>Tolerancia Oral</i>	Supresión específica de las respuestas inmunes celulares y/o humorales a un antígeno mediante la administración previa del antígeno por vía oral (Rezende & Weiner, 2018).

Término	Definición
<i>Tumor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF-α)</i>	Citocina producida por macrófagos y células T que tiene múltiples funciones en la respuesta inmune que ayuda a prevenir la propagación de una infección dentro del cuerpo (Murphy, 2012).

Introducción

La infección por rotavirus es la principal causa de muerte por gastroenteritis deshidratante en niños menores de 5 años (Crawford et al., 2017). Su vía de entrada es la oral y su principal sitio de replicación son los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado, donde produce alteración del metabolismo de las proteínas membranales y muerte celular, induciendo diarrea malabsortiva y osmótica (Angel, Franco, & Greenberg, 2007).

El principal mecanismo efector de protección inmune frente al rotavirus es a través de la IgA intestinal, la cual se encarga ya sea de impedir la unión y penetración de la partícula viral a la célula blanco mediante su interacción con las proteínas VP4 y/o VP7 del rotavirus, o inhibir la replicación viral intracelular por unión con VP6 durante la transcitosis en los enterocitos (Angel, Franco, & Greenberg, 2007). Ahora bien, para que esta inmunoglobulina pueda ser producida y ejerza su acción protectora requiere de la activación de células T CD4+ para su generación (Crawford et al., 2017). Sin embargo, se ha visto que estas células específicas de rotavirus se encuentran en muy bajas cantidades en niños infectados con el virus (Mesa, Gutiérrez, Duarte-Rey, Angel, & Franco, 2010) (Parra et al., 2014). También serían un factor negativo que puede influir la respuesta a la vacunación con rotavirus (Crawford et al., 2017).

Múltiples estudios (L.-S. Rodríguez, Barreto, Franco, & Angel, 2009) (L. S. Rodríguez, Narváez, Rojas, Franco, & Ángel, 2012) (Mesa et al., 2010) se han realizado para encontrar los posibles reguladores negativos que pudieran estar provocando una baja respuesta de células T, necesaria para la inmunidad contra rotavirus (Crawford et al., 2017). Se ha descrito que el TGF β , una citocina que juega un papel importante para mantener la tolerancia a los alimentos y microorganismos comensales (Kelly, Houston,

Sherwood, Casulli, & Travis, 2017) (Travis & Sheppard, 2014), puede estar funcionando como un regulador negativo de la respuesta inmune frente al rotavirus.

En estudios realizados *in vitro* en el Instituto de Genética de la Pontificia Universidad Javeriana, se mostró que esta citocina (producida probablemente por los enterocitos) está asociada con la disminución en el desarrollo de una respuesta protectora (L.-S. Rodríguez et al., 2009) (L. S. Rodríguez et al., 2012). Sin embargo, al administrar un anticuerpo neutralizante contra la citocina (anti-TGF β) parece ocurrir, en forma variable, el efecto inverso, es decir, menor protección, asociado a la inhibición de la respuesta de IgA contra el virus (Rey et al., 2019). Al administrar un inhibidor del TGF β por vía intraperitoneal (diluido en DMSO) existe una tendencia a ver el mismo efecto que con el anticuerpo neutralizante, pero esto no es claro pues los ratones tratados solo con DMSO parecen tener también una atenuación de la respuesta inmune (Rey et al., 2019). Por lo tanto, el papel del TGF β no está totalmente claro en el modelo. Sin embargo, se han descrito varios casos en los que algunos microorganismos pueden inducir TGF β para evadir la respuesta inmune. Por ejemplo, se ha demostrado que los productos secretados del nematodo intestinal *H. polygyrus* activan la vía de señalización del TGF β para inducir células T reguladoras *in vitro* (Maizels, Smits, & McSorley, 2018). Y en otros modelos *in vivo* de infección por Influenza, se ha visto que durante la respuesta inmunitaria temprana al virus, el TGF β , producido principalmente por células epiteliales bronquiales, limita la producción de IFN β induciendo disminución de un efecto antiviral y aumento de la replicación viral, lo que conlleva al aumento de pérdida de peso inducido por el virus, inflamación y cambios histopatológicos (Denney, Branchett, Gregory, Oliver, & Lloyd, 2018). Sin embargo, cuando TGF β es directa o indirectamente anulado genéticamente del epitelio pulmonar de ratones infectados con influenza, la respuesta de IFN β aumenta y los ratones se protegen de la enfermedad (Denney et al., 2018). De tal forma que este modelo permite apoyar la hipótesis de que el rotavirus induce TGF β para evadir temporalmente la inmunidad antiviral y favorecer su replicación.

En el presente trabajo se evaluará si la infección con el rotavirus heterólogo induce TGF β a nivel sistémico e intestinal y si la inhibición del receptor 1 de la citocina con Galunisertib (un nuevo inhibidor de la vía de señalización del receptor I del TGF β con efecto directo en el intestino) (Tauriello et al., 2018) modula los niveles de esta y la severidad de la diarrea inducida por el rotavirus.

1.Estado del Arte

1.1 Epidemiología y Estructura del Rotavirus

La infección por rotavirus es la principal causa de muerte por diarrea deshidratante en niños menores de 5 años en todo el mundo (Crawford et al., 2017). De acuerdo con los reportes hechos en 2016 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que a nivel mundial ocurrieron 215.000 muertes infantiles durante 2013, debido a la infección por rotavirus (World Health Organization, 2016). El 65% de todas estas muertes por rotavirus, ocurrieron en países de Asia y África, principalmente en la India con un 22% de las muertes, seguido de Nigeria (14%) y Pakistán (7%) (World Health Organization, 2016).

En Latinoamérica y el Caribe se estima que anualmente la infección por rotavirus es responsable de generar 10 millones de casos por diarrea, 2 millones de visitas al médico, 75 000 hospitalizaciones y entre 15 000 y 45 000 muertes en niños menores de 5 años (Ludert, Pujol, & Arbiza, 2017).

Los rotavirus son virus de ARN bicatenario sin envoltura (dsARN), con un genoma segmentado rodeado por una cápside proteica de tres capas (Crawford et al., 2017). Cada segmento de dsARN del genoma codifica una proteína distinta, a excepción del segmento 11 que en algunos virus codifica para dos proteínas (NSP5 y NSP6) (Hu, Crawford, Hyser, Estes, & Prasad, 2012). De estas proteínas codificadas por el genoma viral seis son proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y seis son proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6) (Crawford et al., 2017) (Hu et al., 2012). Las 6 proteínas estructurales forman la arquitectura de las tres capas concéntricas de la partícula del rotavirus, mientras que las proteínas no estructurales, excepto NSP1, son esenciales para la replicación del virus (Hu et al., 2012).

Básicamente la estructura del virus consiste en una capa interna formada principalmente por VP2, que junto a las enzimas VP1 y VP3 y el genoma viral componen el centro del virión; luego se encuentra la proteína VP6 formando la capa media de la cápside; y finalmente se ubica la capa más externa que consta de 260 trímeros de la glicoproteína VP7, el mayor constituyente de la capa, y 60 espículas de VP4 que sobresalen de la capa proteica de VP7 (Ruiz, Leon, Díaz, & Michelangeli, 2009).

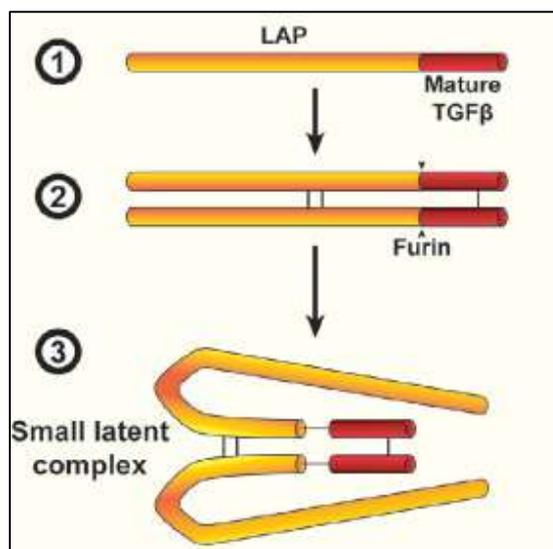
1.2 Estructura, activación y señalización del TGFβ

El TGFβ (del inglés, *Transforming Growth Factor-β*) es miembro de una subfamilia de citocinas que en mamíferos comprende tres isoformas distintas: TGFβ1, TGFβ2, y TGFβ3. A pesar de que estas isoformas presentan una alta homología, cumplen funciones distintas, siendo el TGFβ1 la isoforma más abundante secretada por células del sistema inmunitario (Kelly et al., 2017). Cada una de las isoformas es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso en forma de proproteína que contiene un péptido señal que es clivado, dando lugar a una conformación proteica que incluye un dominio N-terminal llamado LAP (del inglés, *Latency-associated peptide*) y un dominio C-terminal más pequeño que comprende la proteína TGFβ activa. Esta proproteína viaja al complejo de Golgi formando un homodímero que luego, por acción de una furina endoproteasa, forma un pequeño complejo de latencia (del inglés, *Small latent complex, SLC*) que comprende el TGFβ activo (dominio N-terminal) rodeado por el LAP (dominio C-terminal) (Kelly et al., 2017) (Figura 1-1).

Este complejo formado por uniones no covalentes entre ambos dominios es una forma inactiva del TGFβ, ya que la presencia del LAP impide la interacción de la citocina y la señalización a través de los receptores de TGFβ (Travis & Sheppard, 2014). Ahora bien, para que la citocina pueda cobrar actividad, unirse a su receptor y adquirir las funciones biológicas, se requieren distintos mecanismos para retirar el LAP (Worthington et al., 2015). Por ejemplo, un potencial activador del TGFβ es la trombospondina-1 (TSP-1, del inglés *thrombin-activated platelets*), una glicoproteína matricelular expresada y secretada por distintos tipos celulares que incluyen células endoteliales, fibroblastos, células musculares, células del sistema inmune y plaquetas (Zhao, Isenberg, & Popel, 2018). La TSP-1 puede unirse directamente a LAP a través de interacciones entre secuencias específicas de aminoácidos encontradas en LAP (LSKL) y en trombospondina (KRFK), facilitando de esta

forma la liberación de la forma activa de la citocina, haciéndola accesible a su receptor (Murphy-Ullrich & Suto, 2018). Sin embargo, actualmente el papel de las integrinas ($\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 8$ o $\alpha\beta 6$) (Murphy-Ullrich & Suto, 2018) en la activación del TGF β parece más importante, y esto ha sido confirmado por el hecho de que ratones “knockout” para algunas de estas integrinas desarrollan respuestas inflamatorias en el pulmón (Munger et al., 1999), desarrollo vascular defectuoso en el SNC (Zhu et al., 2002) o en estudios más recientes se observó alteración de la homeostasis pulmonar durante infecciones respiratorias (Meliopoulos et al., 2016). Todas estas alteraciones fueron relacionadas con fallas en la activación óptima de TGF β activo (Travis & Sheppard, 2014).

Figura 1-1: Estructura, síntesis y procesamiento del TGF β para la formación del pequeño complejo de latencia.



(1) El TGF β es sintetizado como una proproteína que está formada por LAP (*Latency-associated peptide*) y la región activa de TGF β . (2) La proproteína se dimeriza y luego es clivada por una proteasa. (3) Formación del pequeño complejo de latencia que consiste en el TGF β activo rodeado por LAP. Adaptado de (Kelly et al., 2017).

La estructura del receptor del TGF β comprende un complejo tetramérico formado por dos receptores homodiméricos: El receptor de tipo I (TGF β RI), también conocido como ALK5 (del inglés, *Activin Receptor-like Kinase 5*) y el receptor de tipo II (TGF β RII) (Travis & Sheppard, 2014). Las tres isoformas de la citocina inicialmente se unen al homodímero del TGF β RII, esto permite el reclutamiento del TGF β RI formando de esta manera el

receptor tetramérico. Una vez formado el complejo ligando-receptor se inicia una cascada de señalización que es conocida como la vía clásica de señalización del TGF β (pueden darse otras vías de señalización independientes de Smad) que comienza con la fosforilación del tallo citoplasmático de TGF β RI por parte de TGF β RII y culmina con el reclutamiento y fosforilación de factores de transcripción intracelulares de la familia Smad (del inglés, *Similar to Mothers Against Decapentaplegic*), específicamente Smad2/3. Estos últimos, una vez fosforilados, forman un trímero con Smad4 que luego se translocará al núcleo y se unirá a sus elementos de respuesta (SREs, *Smad-responsive elements*) en el ADN para finalmente iniciar la transcripción y regulación de la expresión de genes (Kelly et al., 2017) (Travis & Sheppard, 2014) para la diferenciación celular, proliferación, apoptosis, migración y producción de matriz extracelular (Min et al., 2018).

1.3 Importancia del TGF β en la respuesta inmunitaria

El TGF β es producido por un gran número de células inmunitarias y en particular por linfocitos, macrófagos y células dendríticas (Travis & Sheppard, 2014) (Owen et al., 2015). Dependiendo del medio al que es expuesto, el TGF β puede tener funciones pro o antiinflamatorias (Travis & Sheppard, 2014).

En el contexto proinflamatorio el TGF β , por un lado, puede favorecer junto con otras citocinas (IL-6, IL-1 β e IL-23) el desarrollo de células Th17 proinflamatorias, cruciales en respuesta a bacterias y hongos, así como en desórdenes autoinmunes (Kelly et al., 2017) (Korn, Bettelli, Oukka, & Kuchroo, 2009). Por otro lado, el TGF β actuando en sinergia con IL-4 induce la expresión de PU.1 que es un factor de transcripción fundamental para la producción de IL-9 por parte de células Th9, que es un subtipo de células T efectoras que cumplen un importante papel en enfermedades autoinmunes y en inflamación alérgica (Kelly et al., 2017) (Jabeen & Kaplan, 2012).

En el contexto antiinflamatorio, el TGF β cumple un papel importante en la regulación de la respuesta inmune adaptativa por medio de la inducción y estabilización de la función de los Linfocitos T reguladores Foxp3+ (Franco-Cortés, 2016), que se sabe son cruciales en la supresión de la inflamación (Kelly et al., 2017). El efecto de esta citocina sobre estas células está dado principalmente por la inducción de la expresión de Foxp3 tanto en células

T reguladoras naturales (*Thymic T regs*, *tTregs*) (Konkel, Jin, Abbatiello, Grainger, & Chen, 2014) como en células T reguladoras inducidas (Chen et al., 2003) (Kelly et al., 2017).

Por otra parte, el TGF β puede inhibir la diferenciación de células Th1 a través de la supresión directa de T-bet que se sabe es un factor de transcripción maestro en la diferenciación del linaje celular Th1 (Lazarevic, Glimcher, & Lord, 2013). Además, esta citocina es capaz de regular negativamente la expresión de IL-12R β 2 sobre células T, reduciendo así su capacidad de respuesta a IL-12, que actúa para inducir una segunda expresión de T-bet para estabilizar el fenotipo Th1 (Kelly et al., 2017). TGF β también puede controlar la diferenciación de células Th1 a través de la regulación de IFN- γ producido por células NK (Travis & Sheppard, 2014) (Laouar, Sutterwala, Gorelik, & Flavell, 2005). Con respecto a las células Th2, TGF β también cumple un papel crucial en la regulación de la respuesta mediada por este linaje celular por disminución directa de GATA3, que es el factor de transcripción maestro en la diferenciación de células Th2 (Kelly et al., 2017) (Gorelik, Fields, & Flavell, 2000). Con todo esto, se puede decir que el TGF β podría, en cierto modo, promover la persistencia de patógenos cuando su efecto neto es antiinflamatorio o reducirla cuando es proinflamatorio (Franco-Cortés, 2016).

1.4 Galunisertib: Un importante inhibidor de la vía de señalización del receptor I del TGF β

El Galunisertib (LY2157299) es el primer inhibidor de moléculas pequeñas (SMIs, del inglés, *small-molecule inhibitor*) biodisponible por vía oral que actúa sobre la vía de señalización mediada por kinasas de serina/treonina del receptor de TGF β de tipo I (ALK5), específicamente regulando negativamente la fosforilación de SMAD2, aboliendo la activación de la vía clásica de señalización del TGF β (Herbertz et al., 2015) (Melisi et al., 2018).

El Galunisertib (el cual la primera parte del nombre “Gal” va referida al médico Greco-Romano Galeno) (Herbertz et al., 2015) es un inhibidor de la clase dihidropirrolpirazol que fue sintetizado mediante síntesis convergente para generar un compuesto químico con la fórmula *4-[2-(6-methylpyridin-2-yl)-5,6-dihydro-4H-pyrrolo[1,2-b]pyrazol-3-yl]quinoline-6-carboxamide monohydrate*. Posteriormente, mediante estudios de cristalografía se observó que Galunisertib se une al sitio de unión a ATP del receptor I

de TGF β (TGF β RI) (Yingling et al., 2018), denominándosele como un inhibidor selectivo de ATP-mimético (X. Liu, Yu, Chen, & Zhang, 2016).

Este inhibidor fue identificado por la compañía farmacéutica Eli Lilly and Company luego de un largo proceso de ensayos en células dependientes de TGF β donde se compararon distintos compuestos similares (LY580276, LY364947, LY2109761) por su capacidad para inhibir la autofosforilación del dominio quinasa TGF β RI humano aislado. El monohidrato LY2157299 reunió las características deseadas de IC₅₀ (concentración inhibitoria media: 56nM) (Cong, Xia, & Yang, 2014) y baja toxicidad cardiovascular, gastrointestinal, inmune, reproductiva y renal en modelos de ratas y perros (Kelly M Credill, 2014).

Debido a estos bajos perfiles de toxicidad en modelos *in vivo* se preparó un esquema para la estandarización de la primera dosis en humanos (FHD, del inglés *First-in-human dose*) correspondientes a la fase I del desarrollo clínico que incluía toxicología preclínica y desarrollos de modelos predictivos de farmacocinética y farmacodinámica. En modelos de ratón, rata y perros se encontró que la vida media fue menos de 3 horas (Herbertz et al., 2015), mientras que en humanos la vida media fue de aproximadamente 8 horas (Brandes et al., 2016). Sin embargo, se ha visto en modelos de escala alométrica que el efecto farmacodinámico del inhibidor de reducir pSMAD2 era todavía detectable en tejido tumoral y células mononucleares de sangre periférica hasta por 7 días luego de culminar la administración con Galunisertib. De tal forma que, debido a estos resultados, se realizaron esquemas de dosificación intermitentes ya que la dosificación continua puede aumentar el riesgo de toxicidad crónica (Herbertz et al., 2015).

El efecto inhibidor del Galunisertib ha sido explotado principalmente en inmunoterapia del cáncer, donde ha ejercido un efecto antitumor en modelos animales de cáncer de mama, glioblastoma, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular y cáncer colorectal (Herbertz et al., 2015). En pacientes con glioblastoma, que fue el modelo que se usó para realizar los primeros ensayos clínicos, se observó una reducción en pSMAD2 en la mayoría de pacientes tratados con Galunisertib, lo que se tradujo en la reducción de la expresión de dos genes (Id1 y CD44) que son regulados por el TGF β (García-Dorado et al., 2010). En carcinoma hepatocelular (HCC) se ha visto que la expresión de TGF β está asociada con la progresión temprana y tardía de este tipo de cáncer y que las células HCC

pueden secretar TGF β 1 de forma autocrina, de manera tal que el bloqueo de este circuito de retroalimentación puede tener un impacto beneficioso en el control de la progresión tumoral (Herbertz et al., 2015). En efecto, en pacientes con HCC se observó que el Galunisertib es capaz de reducir la concentración plasmática no solo de TGF β 1 sino también de E-cadherina, una molécula de adhesión que en presencia de TGF β se elimina de las células tumorales y hace que estas sean más invasivas y migratorias. (Giannelli, Villa, & Lahn, 2014).

Uno de los nuevos usos terapéuticos encontrados en Galunisertib ha sido en el modelo de cáncer colorrectal (CRC) donde el TGF β juega un importante rol, no solo en la fisiología del colon normal, sino también en el desarrollo de la patología y en su proceso metastásico, lo que significa que la estrategia de inhibir la vía de señalización del TGF β puede conducir a la alteración en el proceso de metástasis en CRC (Villalba, Evans, Vidal-Vanaclocha, & Calvo, 2017). De hecho, se ha reportado en estudios realizados en modelos de ratón, que el Galunisertib es capaz de reducir la expresión de genes altamente regulados por el TGF β . Por ejemplo, en modelos de metástasis experimental generada a partir de células KM12L4a que secretan TGF β se mostró una marcada regulación positiva de IL-11, una citocina de unión a GP130, una glicoproteína importante para la señalización mediada por STAT3 en el inicio de la metástasis por células estromales estimuladas por TGF β . De forma interesante, se observó que al tratar con el inhibidor a ratones portadores de tumores derivados de células madre de CRC los niveles de expresión del gen *il11* se redujeron a niveles basales (Calon et al., 2012). Esta reducción también se observó con otros genes altamente relacionados a la expresión TGF β , tales como *Serpine1* que codifica para la glicoproteína inhibidora del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) que regula la formación de plasminógeno a plasmina, lo que favorece la invasión de células cancerosas al degradar la matriz extracelular (Mazzoccoli et al., 2012) (Calon et al., 2012). Y de hecho, se ha visto que altas concentraciones plasmáticas preoperatorias de PAI-1 están asociadas con una supervivencia más corta en pacientes con cáncer colorrectal (Mazzoccoli et al., 2012).

Todo esto en conjunto apoya el hecho de que el Galunisertib es un potente inhibidor a nivel intestinal, y que al ser administrado por vía oral en ratones adultos produce una robusta respuesta inmunitaria (Tauriello et al., 2018) y una disminución de la expresión de genes altamente regulados por el TGF β (Calon et al., 2012).

2. Justificación y Planteamiento del Problema

2.1 Estudios *in vitro* del TGF β en la respuesta inmune contra rotavirus

En estudios realizados en niños y adultos infectados con rotavirus se observó que la respuesta de Linfocitos T circulantes en sangre periférica parece ser de baja intensidad comparada con la respuesta a otros virus (Jaimes et al., 2002). Mas aún, se observó que niños y adultos sanos, las células T CD4+ y CD8+ específicas de rotavirus secretan IFN- γ (las células que secretan combinaciones de IFN- γ , IL-2 y TNF- α parecen relativamente bajas), sugiriendo que la principal alteración en la respuesta T contra el virus es su calidad (representa las características de una célula T eficiente) y no tanto la cantidad de las células y los mediadores producidos, pues la respuesta protectora contra muchos patógenos involucra linfocitos multifuncionales (Parra *et al.*, 2014). Estos resultados impulsaron a realizar estudios más a profundidad, para identificar posibles inmunomoduladores que pudieran estar inhibiendo la respuesta inmune antiviral. De tal manera que para poder alcanzar este objetivo se infectaron *in vitro* líneas celulares epiteliales humanas de intestino (*CEI, células Caco-2, human epithelial colorectal adenocarcinoma cells*) encontrando que la infección por rotavirus indujo la secreción de PGE2 y TGF β 1, los cuales son inmunomoduladores importantes en la respuesta inmunitaria a rotavirus (L.-S. Rodríguez et al., 2009). En un estudio complementario se midió la expresión de ARNm del TGF β después de la infección por rotavirus de células Caco-2 y también se encontró elevado (L. S. Rodríguez et al., 2012). La PGE2 se ha visto que puede inducir la activación de células T reguladoras y por ende una respuesta inmunitaria supresora, y en el caso de TGF β 1 se ha visto que es capaz de modular la tolerancia intestinal y la respuesta de células B intestinales (Baratelli et al., 2005) (L.-S. Rodríguez et al., 2009). Ahora bien, en estos mismos experimentos no se encontraron, en los sobrenadantes de estas células infectadas con rotavirus, otras citocinas como IL-1 β y

TNF- α , que son mediadores inflamatorios importantes encontrados en respuestas a patógenos intestinales (Franco-Cortés, 2016). Todo esto en conjunto hizo sugerir que los sobrenadantes de células infectadas con rotavirus tienden a inducir una respuesta no-inflamatoria (no-Th1) (L.-S. Rodríguez et al., 2009). Esto fue evaluado en un estudio donde se trataron células dendríticas humanas con rotavirus purificado o con sobrenadantes de líneas celulares Caco-2 infectadas con rotavirus y posteriormente se cocultivaron con linfocitos T CD4+ vírgenes alogénicos, de manera tal de poder determinar si el rotavirus, en el contexto de un microambiente intestinal, era capaz de modular la función de células dendríticas y estas a su vez, promover una respuesta tipo Th1 o Th2. En efecto, se encontró que el sobrenadante de células infectadas con rotavirus generó células dendríticas capaces de inducir una respuesta tipo Th1 más baja que aquellas tratadas con virus purificado (L. S. Rodríguez et al., 2012).

Por lo anterior, con el objetivo de establecer si TGF β 1 era responsable de mediar este efecto durante la infección por rotavirus, los sobrenadantes de células Caco-2 se incubaron con anticuerpos anti-TGF β o anti-TSLP (Del inglés, *Thymic stromal lymphopoietin*) antes del tratamiento de las células dendríticas. Cabe decir que estas dos citocinas han sido ampliamente estudiadas como inmunomoduladores de la inmunidad intestinal (Rimoldi et al., 2005) (Iliev, Mileti, Matteoli, Chieppa, & Rescigno, 2009). Se encontró un aumento significativo en la frecuencia de células T CD4+ que producen IFN- γ cuando se bloqueó el TGF β 1 en el sobrenadante de células infectadas con RRV (del inglés, *Rhesus rotavirus*) en comparación con sobrenadantes donde esta citocina no se bloqueó (L. S. Rodríguez et al., 2012). De tal manera que el bloqueo de TGF β 1 incrementó la capacidad de las células dendríticas para promover una respuesta tipo Th1. Todo esto en conjunto sugirió que el TGF β 1 inducido por rotavirus en las células Caco-2 podría ser un mecanismo de evasión inmune, lo que podría explicar la baja respuesta de células T específicas de rotavirus (L. S. Rodríguez et al., 2012).

2.2 Inhibidores del TGF β usados en el estudio de la inmunidad contra rotavirus

Una de las principales estrategias para evaluar la función del TGF β durante la infección por rotavirus es mediante el uso de inhibidores de la señalización del receptor de

TGF β , que tienen como principal ventaja bloquear el sitio de unión del ligando al receptor, o mejor aún, inhibir la actividad kinasa del receptor de TGF β 1 (Colak & ten Dijke, 2017). Esto permite reducir o eliminar el posible efecto inmunomodulador que pudiera estar teniendo el TGF β en la inmunidad contra rotavirus, lo que ayudaría a apoyar o rechazar la hipótesis de que el rotavirus aumenta los niveles de TGF β y promueve una baja respuesta de linfocitos T necesarios para inmunidad contra rotavirus (Franco-Cortés, 2016).

Una aproximación usando este tipo de moléculas ha sido evaluada en estudios *in vitro* con células T CD4+ tratadas con fracciones que contenían microvesículas de CEI infectadas con rotavirus donde se observó que al pretratar estas células con un inhibidor sintético de la señalización del receptor TGF β RI, el ALK5i (del inglés, *Activin receptor-Like Kinase inhibitor*, SB431542) se restauró la viabilidad y la proliferación de estos linfocitos (estimulados policlonalmente), que probablemente estaban siendo modulados por el TGF β presente en éstas microvesículas (Barreto et al., 2010). Estudios *ex vivo* similares se realizaron con células mononucleares de sangre periférica de adultos sanos, en que se observó que al bloquear el TGF β con su inhibidor natural, el LAP, o usando ALK5i, las frecuencias detectadas de linfocitos T CD4+ específicos de rotavirus productores de IFN- γ aumentaron (Mesa et al., 2010). Esto indica que el TGF β probablemente se esté comportando como regulador negativo, lo que hace que la respuesta de células T CD4+ sea poco eficiente (Franco-Cortés, 2016).

Para evaluar el papel del TGF β en la infección por rotavirus en un modelo *in vivo* se han realizado estudios donde se inmunizan ratones neonatos C57BL/6 con un virus heterólogo de simio (RRV, *Rhesus Rotavirus*) en presencia o ausencia de anticuerpos anti-TGF β y anti-LAP. En otros experimentos se administró por vía intraperitoneal y diluido en DMSO un ALK5 inhibidor (ALK5i) de la vía de señalización del receptor del TGF β 1 (TGF β RI) (Rey et al., 2019). En dos de tres experimentos, el anticuerpo contra TGF β disminuyó levemente la capacidad de protección de la vacuna y simultáneamente parecen existir decrementos en la capacidad de la vacuna de inducir Linfocitos T y anticuerpos intestinales IgA específicos de rotavirus (Rey et al., 2019) pero no moduló los niveles de diarrea inducidos por el virus. Por su parte, el ALK5i tampoco modula el desarrollo o intensidad de la diarrea, pero si existe la tendencia de este compuesto a inhibir la respuesta de IgA y linfocitos T específicos de rotavirus. Sin embargo, de acuerdo con la literatura, los ratones control, que solo recibieron el diluyente (DMSO) tuvieron la tendencia a tener respuestas T más bajas que los ratones que no recibieron DMSO (Lin et al., 2015),

sugiriendo que el diluyente puede afectar los resultados experimentales. Un aspecto importante a mencionar es que este inhibidor solo se puede administrar por vía intraperitoneal (Segawa et al., 2010) y a la fecha no se ha demostrado que tenga un efecto claro a nivel intestinal. Lo ideal sería tener un inhibidor, administrado en un diluyente inocuo, que pueda ser administrado por vía oral de forma que pueda tener un efecto directo en el intestino, que es el principal sitio de replicación del rotavirus (Crawford et al., 2017). Una alternativa ideal para este propósito es el uso del Galunisertib (LY2157299 *monohydrate*) que, como fue mencionado anteriormente, es un inhibidor de la cascada de señalización mediada por kinasas de serina/treonina del receptor TGF β RI o ALK5 (Herbertz et al., 2015) que está siendo evaluado en ensayos clínicos como terapia contra el cáncer de colon (Yingling et al., 2018) y que al ser administrado por vía oral en ratones produce una robusta respuesta inmune en el intestino caracterizada por aumento de células T CD4 productoras de IFN- γ y de células T CD8 que expresan GZMB (del inglés, *Granzyme B*) (Tauriello et al., 2018). Este inhibidor es, además, capaz de inhibir la vía clásica de señalización del TGF β RI en la cual el TGF β funciona en forma autocrina, lo que se traduce en disminución de la expresión de genes, no solo de TGF β , sino también de otros genes que son regulados por la citocina (Calon et al., 2012). Si estos resultados se extrapolan a un modelo murino de infección por rotavirus donde se inhiba el TGF β con Galunisertib antes de la vacunación con el virus heterólogo (RRV), se podría determinar si al bloquear la citocina se modulan los niveles de diarrea y la expresión de los genes *TGF β 1*, *Il11* y *Serpine1*. Además, como parte del presente proyecto, uno de los objetivos fue evaluar si el rotavirus, como se ha visto que lo hace *in vitro* (L. S. Rodríguez et al., 2012), induce TGF β a nivel intestinal. Estos resultados ayudarán a clarificar el papel inmunomodulador del TGF β en una infección intestinal viral *in vivo*, sobre lo que poco se conoce a la fecha (Wilén et al., 2018).

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Evaluar los niveles de TGF β y de diarrea inducida durante la infección por rotavirus heterólogo en ratones neonatos tratados o no con Galunisertib, un inhibidor del receptor 1 de la citocina.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Comparar los niveles de ARNm y proteína de TGF β a nivel sistémico e intestinal en ratones neonatos infectados con una cepa de rotavirus de simio a los cuales se les ha inhibido o no el receptor I de la citocina con Galunisertib.
- Comparar los niveles de diarrea inducida por rotavirus de simio en ratones neonatos a los cuales se les ha inhibido o no el receptor 1 de la citocina con Galunisertib.

4. Metodología

4.1 Evaluación de los niveles de expresión de ARNm y producción de TGFβ en animales infectados con RRV

Como primera parte de este objetivo (ver tabla 4-1) se evaluó la producción de TGFβ, a nivel de proteína y ARNm, en ratones C57BL/6 de 4 días de nacidos los cuales, al día 0, recibieron por vía oral 10^6 o 10^7 UFF/mL (Unidades formadoras de foco) de RRV (un virus heterólogo utilizado como cepa vacunal en humanos) en 50μL o 50μL de Mock (sobrenadante de células donde se cultiva el RRV). Luego, cada dos días (hasta el día 12), a tres ratones por grupo se les practicó eutanasia (grupo control y grupo infectado) y se les extrajo sangre, bazo, hígado e intestino, con el fin de medir, mediante ELISA, la concentración de TGFβ a nivel de proteína a partir de suero y contenido intestinal, y medir, mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR), la concentración de TGFβ a nivel de ARNm a partir de muestras de bazo, hígado e intestino. Cabe destacar que el trabajo con animales de esta parte de la metodología fue realizada por Laura Rey, de la Pontificia Universidad Javeriana, como parte de su trabajo de grado orientado al estudio de la respuesta inmune (Rey, 2018).

Tabla 4-1. Esquema general del experimento de infección con RRV

EDAD	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
DPI	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CTRL	MOCK		EUT (n=3)		EUT (n=3)		EUT (n=3)		EUT (n=3)		EUT (n=3)		EUT (n=3)
10^6	VIRUS		EUT (n=3)		EUT (n=3)		EUT (n=3)		EUT (n=3)		EUT (n=3)		EUT (n=3)
10^7	VIRUS		EUT (n=3)		EUT (n=3)		EUT (n=3)		EUT (n=3)		EUT (n=3)		EUT (n=3)

CTRL: Animales no infectados; 10^6 : Animales infectados con 10^6 UFF/mL de RRV; 10^7 : Animales infectados con 10^7 UFF/mL de RRV; EUT: Eutanasia; DPI: Días posinfección con el virus.

4.1.1 Producción de virus

El RRV fue producido en células MA104 (una línea celular de tejido de riñón de mono verde africano) en presencia de tripsina, y posteriormente sometido a un protocolo de semipurificación de virus mediante un gradiente de sacarosa al 40% (Ver anexo A). La determinación del título viral se realizó usando un ensayo de formación de focos (FFA, del inglés, *Focus Forming Assay* (Vancott et al., 2006) (Ver anexo B). El título obtenido fue de 10^9 unidades formadoras de focos por mililitro (UFF/mL)

4.1.2 Animales

Los animales C57BL/6 usados para la experimentación fueron originalmente obtenidos de Charles River (Wilmington MA), criados bajo condiciones libre de patógenos (SPF, del inglés *Specific-pathogen-free*) y alojados, durante los experimentos, en la sala de patógenos en la Unidad de Biología Comparativa (UBC) de la Pontificia Universidad Javeriana. Todos los experimentos, protocolos y procedimientos realizados sobre el modelo murino neonatal (animales C57BL/6) fueron avalados y aprobados por el CICUA (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales) de la Pontificia Universidad Javeriana (Ver anexo F). El CICUA se ciñe a los lineamientos de la Ley 84 y de la Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio "*Guide for the care and use of laboratory animals*" y realiza monitoreos pos-aval. El trabajo también fue aprobado por el comité de investigación y ética de la Facultad de medicina de la Pontificia Universidad Javeriana (Ver anexo E).

4.1.3 Medición de TGF β mediante ELISA

La concentración de TGF β 1 en suero (activo, más latente activado con HCl) y en contenido intestinal (activo espontáneamente, sin activar con HCl) (Gomes-Santos et al., 2017) fue determinado con un kit comercial de ELISA DuoSet para TGF β 1 (R&D) siguiendo las instrucciones del fabricante (Ver Anexo C). Este kit tiene los componentes básicos necesarios para el desarrollo de un ELISA tipo sándwich para medir TGF β 1 natural y recombinante, con un límite de detección de 31.3 pg/mL.

4.1.4 Medición de ARNm de TGFβ mediante RT-qPCR

Para evaluar la expresión de ARNm de TGFβ en intestino, hígado y bazo se realizó PCR cuantitativa relativa. Cada órgano, previamente almacenado en solución conservadora de RNAlater, se homogenizó con Tissue Tearor homogenizer, se resuspendió en solución de TRIzol y cloroformo, y el ARN fue purificado usando columnas de RNeasy minikit de Qiagen. El ARN total de cada órgano (± 2000 ng) se convirtió en ADN complementario (ADNc) usando un kit de síntesis de ADNc (Transcriptor First Stand) de Roche. Tanto el ARN como el ADNc aislado fue cuantificado mediante espectrofotómetro Nanodrop.

Finalmente, para determinar la expresión relativa de TGFβ1, se tomaron aproximadamente 50ng de cDNA en una PCR en tiempo real, en la cual se usó GAPDH (*Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase*) como gen de referencia (*housekeeping gen*). Se utilizó una mezcla maestra (LightCycler 480 probes Master) con sondas de hidrolisis UPL (del inglés, Universal Probe Library, Roche) marcadas con FAM para el gen de interés *tgfb1*, y marcadas con Yellow 555 para el gen de referencia *gapdh*. Las reacciones se realizaron en duplicado y se usó agua grado PCR, como control negativo. La temperatura inicial de denaturación fue de 95°C por 10 min, seguida por 45 ciclos de una reacción de amplificación de tres pasos con temperaturas de denaturación, anillamiento y extensión previamente estandarizadas, de 95°C por 10seg, 60°C (63.4°C para *tgfb1*) por 30seg y 72°C por 10seg, respectivamente. Culminando con un ciclo de enfriamiento y extensión final a 40°C por 10seg. Se usaron los siguientes primers: *Mus musculus tgfb1* (NM_011577.2), Fwd (5'-TGGAGCAACATGTGGAAGCTC-3') y Rev (3'-GTCAGCAGCCGGTTACCA-5'); *Mus musculus gapdh* (Cat. 05 046 211 001), Fwd (5'-ATGGTGAAGGTCGGTGTGA-3') y Rev (3'-AATCTCCACTTTGCCACTGC-5') obtenidos del software Profinder (Roche Applied Science). La PCR en tiempo real se realizó en un LightCycler Nano. Los resultados se expresaron como expresión génica relativa usando el método propuesto por Pfaffl (Pfaffl, 2001) para corregir por la eficiencia de cada gen usando el siguiente modelo matemático, donde E es la eficiencia de la curva estándar:

$$\text{Razón} = \frac{(E \text{ gen de interés})^{\Delta \text{Ct gen de interés (Ct control - Ct muestra)}}}{(E \text{ gen de referencia})^{\Delta \text{Ct gen de referencia (Ct control - C muestra)}}$$

Lo cual determinó el “*fold change o veces de cambio*”, es decir, el número de veces que se expresa el gen (positiva o negativamente) con respecto al grupo control.

4.2 Evaluación de los efectos del Galunisertib sobre la diarrea en animales infectados con RRV

Como segunda parte de este objetivo se utilizó Galunisertib, un nuevo inhibidor del receptor I del TGF β que se administra por vía oral y que se ha demostrado tener un efecto directo en el intestino (Tauriello et al., 2018).

4.2.1 Determinación de la dosis de Galunisertib

Para poder establecer la dosis a usar en los ratones neonatos, se realizó un experimento para estandarizar el protocolo de administración del Galunisertib (todas las dosis de Galunisertib dada a los animales se calcularon de acuerdo con los pesos estimados de los ratones de la UBC). Con base en la literatura (Tauriello et al., 2018) se administraron dos dosis diferentes de Galunisertib, una dosis alta de 720 μ g/g y una dosis baja de 320 μ g/g (Para detalles en la preparación de las dosis, ver anexo D). Además, se consideró el uso reportado de Galunisertib por vía oral (Tauriello et al., 2018) y en esquemas de 1 o 2 veces al día. El experimento se resume en la tabla 4-2:

Tabla 4-2. Esquema de inhibición de Galunisertib en ratones C57BL/6

Grupo	0 horas	12 horas	24 horas	36 horas	48 horas	Dosis
1	X	X	X	X	Eutanasia	720 μ g/g
2	X		X		Eutanasia	720 μ g/g
3	X	X	X	X	Eutanasia	320 μ g/g
4	X		X		Eutanasia	320 μ g/g
5	X	X	X	X	Eutanasia	Diluyente

Se tuvieron 5 grupos experimentales, en los cuales se usaron dos ratones C57BL/6 de 4 días de nacidos por grupo. En las primeras 4 condiciones experimentales se administró por vía oral, el Galunisertib: 720 μ g/g de forma continua (Grupo 1), 720 μ g/g de forma intermitente (Grupo 2), 320 μ g/g de forma continua (Grupo 3), 320 μ g/g de forma intermitente (Grupo 4). Finalmente, el último grupo correspondió a los animales controles, es decir, el grupo 5 solo recibió el diluyente del fármaco (1% carboximetilcelulosa de sodio, 0.4% lauril sulfato de sodio, 0.05% anti-espumante A (de Sigma) y 0.085% polivinilpirrolidona) (Tauriello et al., 2018) (Para detalles de la función de cada reactivo del diluyente, ver Glosario de términos).

A las 46-48 horas después de la primera dosis, a los ratones se les practicó eutanasia por dislocación cervical y el intestino delgado se obtuvo para evaluar el ARNm de TGF β 1 y de 2 genes regulados por la citocina. Es decir, el efecto del Galunisertib se midió tanto por el efecto sobre el ARNm del TGF β , y además, indirectamente con la disminución de los niveles de ARNm de genes modulados por el TGF β , como son *Serpine1* (gen que codifica para la glicoproteína inhibidora del activador del plasminógeno 1, del inglés *Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1*) (Laping, 2002) e *Il11* (gen que codifica para interleucina 11, IL-11) (Calon et al., 2012).

4.2.2 Esquema de tratamiento

El tratamiento con Galunisertib se comenzó al día -1 (ratones de 4 días de edad) por vía oral y a la dosis seleccionada previamente. Al siguiente día (Día 0), los grupos que corresponden recibieron por vía oral con sonda orogástrica aproximadamente 50 μ L de 10⁶ UFF/mL de RRV o “mock” y se les siguió el tratamiento con Galunisertib o el diluyente escogido en el experimento de estandarización a los ratones infectados. Luego, durante 5 días (a partir del día 0) se les evaluó la presencia e intensidad de la diarrea, esto significa: presencia de heces diarreicas después de la palpación suave del abdomen. La severidad de la diarrea fue evaluada por un experimentador que desconocía los tratamientos (en ciego), hasta que ésta desapareció (aprox. 4-5 días). Se evaluaron los siguientes parámetros:

Tabla 4-3. Evaluación cuantitativa de la severidad de la diarrea en ratones C57BL/6

N° de Camada							
N° de Animal o tratamiento							
Severidad de la Diarrea	Puntaje	Parámetro					
Color de la diarrea	2	Amarillo					
	1	Amarillo – Marrón					
	0	Marrón					
		Total					
Grado de Suciedad Perianal	2	Muy sucio					
	1	Algo sucio					
	0	Limpio					
		Total					
Consistencia de las heces	3	Muy líquida					
	2	Líquida					

	1	Pastosa					
	0	Sólida					
	Total						

Para evaluar el efecto del Galunisertib sobre los niveles de TGF β y los genes que esta citocina modula, a los días 1, 2, 3 y 12 post vacunación se les practicó eutanasia a 3 ratones de cada grupo (sin darles la dosis de inhibidor ese día) para obtener intestino delgado y evaluar el ARNm de los genes seleccionados *tgf β 1*, *serpine1* e *il11*. El esquema general del procedimiento se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 4-4. Esquema general del experimento de inhibición con Galunisertib en ratones vacunados o no con RRV

DPI	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EDAD	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
DIA 1 CTRL		MOCK	DIAR EUT											
DIA 2 CTRL		MOCK	DIAR	DIAR EUT										
DIA 3 CTRL		MOCK	DIAR	DIAR	DIAR EUT									
DIA 12 CTRL		MOCK	DIAR	DIAR	DIAR	DIAR	DIAR							EUT
DIA 1 GAL	GAL	RRV GAL	DIAR EUT											
DIA 2 GAL	GAL	RRV GAL	DIAR GAL	DIAR EUT										
DIA 3 GAL	GAL	RRV GAL	DIAR GAL	DIAR GAL	DIAR EUT									
DIA 12 GAL	GAL	RRV GAL	DIAR GAL	DIAR GAL	DIAR GAL	DIAR GAL	DIAR GAL	GAL	GAL	GAL	GAL	GAL	GAL	EUT
DIA 1 DIL	DIL	RRV DIL	DIAR EUT											
DIA 2 DIL	DIL	RRV DIL	DIAR DIL	DIAR EUT										
DIA 3 DIL	DIL	RRV DIL	DIAR DIL	DIAR DIL	DIAR EUT									
DIA 12 DIL	DIL	RRV DIL	DIAR DIL	DIAR DIL	DIAR DIL	DIAR DIL	DIAR DIL	DIL	DIL	DIL	DIL	DIL	DIL	EUT
DPI	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EDAD	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17

El tratamiento se comenzó al día -1 (ratones de 4 días de edad) por vía oral a la dosis seleccionada previamente (320µg/g o 720µg/g). Al siguiente día (Día 0), los grupos correspondientes (GAL: Galunisertib, DIL: diluyente de Galunisertib y CTRL: Controles) recibieron por vía oral con sonda orogástrica aproximadamente 50 µL de 10⁶ UFF de RRV (Grupo GAL y Grupo DIL) o 50 µL de Mock (Grupo control). Luego, durante 5 días posterior a la inoculación con el virus o con Mock, se les evaluó la presencia e intensidad de la diarrea (DIAR). El tratamiento con Galunisertib se continuó dando en algunos grupos hasta los días estipulados para la eutanasia (EUT) de estos. Estas se practicaron a los días 1, 2, 3 y 12 post vacunación a 3 ratones de cada grupo (sin darles la dosis de inhibidor ese día) para obtener intestino delgado para evaluar el ARNm de los genes seleccionados, y además suero y contenido intestinal para evaluar por ELISA el nivel de TGFβ1 a nivel de proteína.

4.3 Evaluación de los niveles de expresión de ARNm y de producción de TGFβ en animales infectados con RRV y tratados o no con Galunisertib

4.3.1 Medición de ARNm de *tgfβ1*, *serpine1* e *il11* mediante RT-qPCR

Para determinar la expresión relativa de los genes seleccionados: *tgfβ1*, *Serpine1* e *Il11*, 50ng de ADNc se utilizó una PCR en tiempo real en la cual se usó GAPDH (*Glyceraldehyde_phosphate_dehydrogenase*) como gen de referencia (*housekeeping gen*). En este caso, se utilizó TaqMan™ Fast Advanced Master Mix, ensayos de expresión génica Taqman que contienen primers específicos de genes y sondas de hidrólisis Taqman marcadas con FAM (Taqman Gene Expression Assays de Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Los conjuntos de sondas/primers utilizados fueron: *tgfβ1* (Mm01178820_m1); *Il11* (Mm00434162_m1); *Serpine1* (Mm00435860_m1) y *gapdh* (Mm99999915_g1).

Las reacciones fueron realizadas en duplicado y se usó agua grado PCR como control negativo. La temperatura inicial de denaturación fue de 95°C por 2min, seguida por 40 ciclos de una reacción de amplificación de dos pasos con temperaturas de denaturación, anillamiento/extensión de 95°C por 1seg y 60°C por 20seg, respectivamente. Los resultados se expresaron como se mencionó antes, a través del método Pfaffl de expresión génica relativa (Pfaffl, 2001).

4.3.2 Análisis Estadístico

Mediante el uso de estadística no paramétrica se realizaron comparaciones entre los grupos. Para la evaluación del porcentaje de animales con diarrea y análisis de mortalidad se usó prueba de Fisher, y para la evaluación de la intensidad de la diarrea se usó prueba Mann Whitney. Ambas pruebas se realizaron mediante el programa GraphPad Prism 6 (Graph pad software, inc. San Diego, CA). Una $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

5. Resultados

5.1 Evaluación de los niveles de expresión de ARNm y de producción de TGFβ en animales infectados con RRV

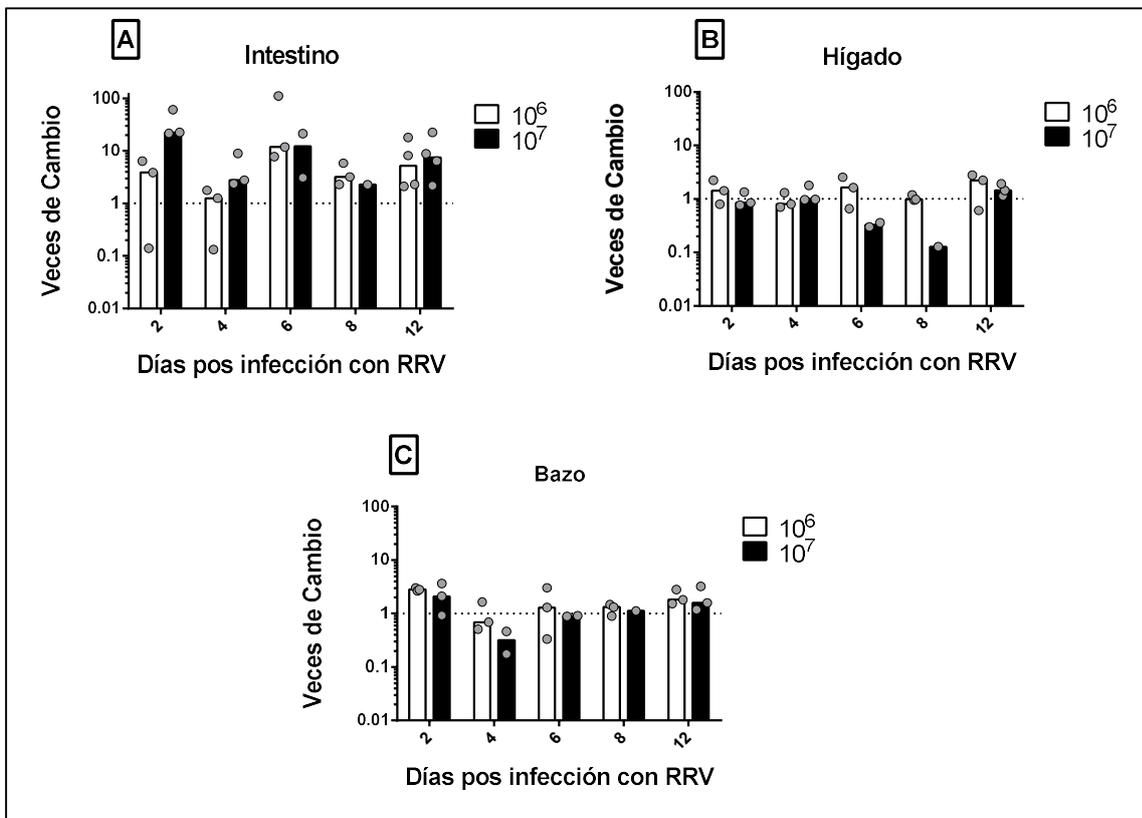
Se sabe que la infección por rotavirus de simio, RRV o SA11, aumenta los niveles de TGFβ1 en células Caco-2 (L.-S. Rodríguez et al., 2009) o en células HT29 (Chanda, Nandi, & Chawla-Sarkar, 2016), respectivamente. Con el objetivo de apoyar o no la hipótesis que la infección por rotavirus heterólogo induce TGFβ en un modelo *in vivo*, ratones neonatos C57BL/6 entre 5 a 7 días de edad fueron infectados con dos dosis de RRV, un virus vacunal que se sabe induce protección en ratones, pero que sigue siendo virulento, traduciéndose en una diarrea leve en los animales durante 5 días (Vancott et al., 2006).

Se determinó el nivel de transcripción del ARNm de TGFβ1 en los días 2, 4, 6, 8, 10 y 12 posteriores a la infección con 1×10^6 UFF/mL RRV o 1×10^7 UFF/mL RRV en intestino (intestino delgado y grueso), hígado y bazo en ratones lactantes de 5 días de nacidos.

Ratones infectados con la dosis mayor (1×10^7 UFF/mL de RRV) tuvieron incremento de la expresión relativa del transcrito del gen para *tgfb1* en el intestino a todos los distintos puntos de tiempo evaluados (Figura 5-1A), especialmente en los días 2 y 12 posinfección, con una mediana de 22,3 veces y 7,5 veces comparado con los ratones no infectados, respectivamente. En el caso de los ratones infectados con la dosis menor (1×10^6 UFF/mL de RRV) también se observó un incremento consistente al día 8 y 12, con valores de mediana en 3,1 y 5,2, respectivamente (Figura 5-1A). Al día 6, en los ratones vacunados, ya sea con la dosis mayor o menor, se observó un incremento de la mediana de 12 veces, sin embargo, los datos presentan mucha variabilidad, por lo que es difícil establecer una conclusión.

En hígado y en bazo solo se observaron leves incrementos (2 veces comparado con los ratones no infectados) en la expresión relativa del gen en animales infectados (Figura 5-1B-C). De tal forma que estos resultados indican que la infección con RRV produce regulación positiva del gen *tgfb1* en el intestino, pero no (o en muy bajos niveles) en hígado y bazo.

Figura 5-1: Niveles de ARNm de *tgfb1* a distintos puntos de tiempo luego de la infección con RRV

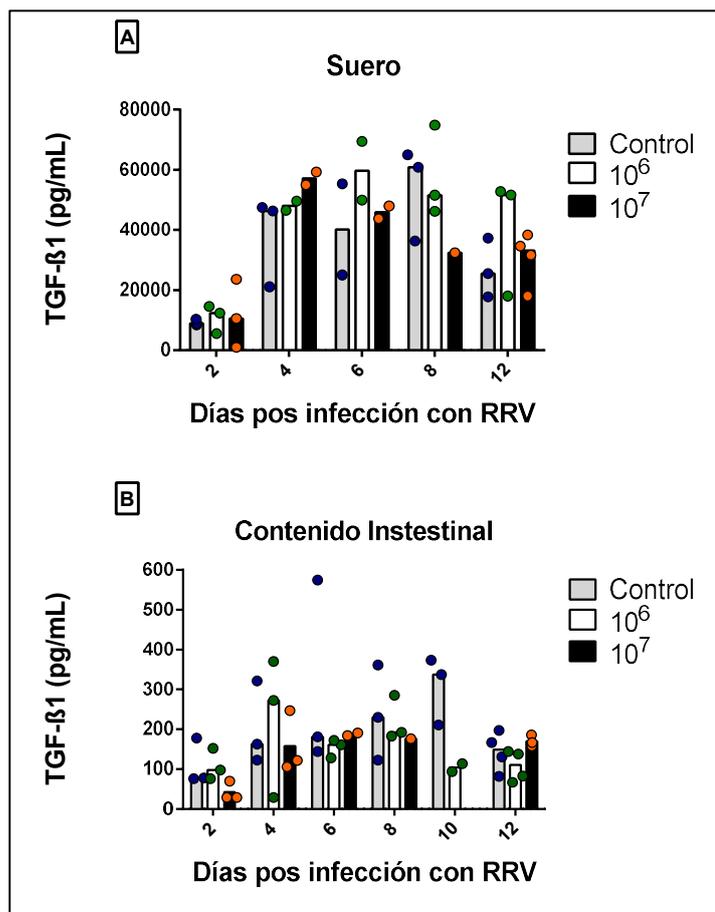


Ratones C57BL/6 fueron vacunados con 10^6 UFF/mL o 10^7 UFF/mL de RRV. A los días 2, 4, 6, 8, 10 y 12 posinfección, a 1 a 4 ratones de cada grupo (representados en círculos grises) se les practicó eutanasia para obtener intestino, hígado y bazo para evaluar niveles de ARNm de *tgfb1*. El *fold-change* o *veces de cambio* de las muestras de animales infectados fue calculado por el método Pfaffl (Pfaffl, 2001) en comparación con ratones no infectados y utilizando niveles de ARNm de *gapdh* endógenos para la normalización. Se muestran los niveles de ARNm del gen *tgfb1* en (A) intestino (B) hígado, y (C) bazo. Los datos se muestran en escala logarítmica en base 10, las barras representan la mediana del grupo y los valores por encima o por debajo de 1 (línea punteada) indica

regulación positiva o negativa del gen, respectivamente. Las muestras del día 10 no se incluyeron en el análisis porque solo se tenían datos de los animales controles e infectados con 10^6 , pero no de aquellos infectados con 10^7 .

Posteriormente se determinó, mediante ELISA, la concentración de TGF β 1 en suero y contenido intestinal (porción de intestino delgado y colon con contenido fecal). En contraste con los resultados de expresión génica encontrados en intestino, al día 2 y 12 posinfección, en suero (Figura 5-2A) y contenido intestinal (Figura 5-2B) no se observó ningún incremento de TGF β 1 en los ratones infectados con algunas de las dos dosis, en comparación con los ratones no infectados, además, los datos presentan mucha variabilidad para generar alguna conclusión.

Figura 5-2: Niveles de TGF β 1 en suero y contenido intestinal a distintos puntos de tiempo luego de la infección con RRV

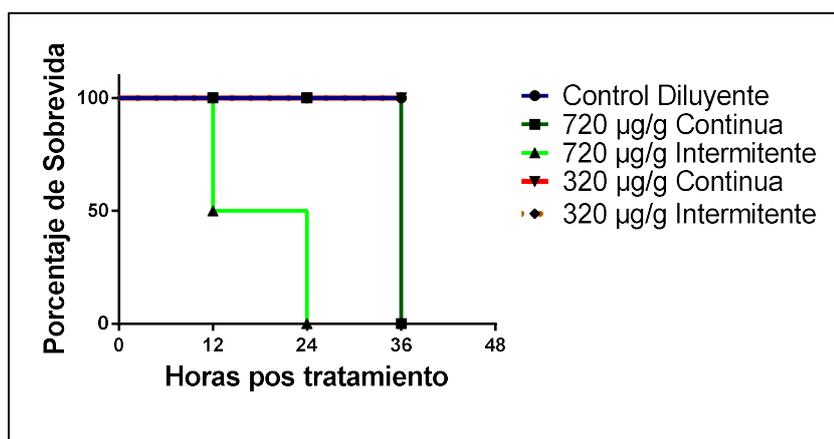


Ratones C57BL/6 fueron infectados con 10^6 UFF/mL o 10^7 UFF/mL de RRV. A los días 2, 4, 6, 8, 10 y 12 posinfección 1 a 4 ratones de cada grupo se les practicó eutanasia para obtener suero y contenido intestinal para evaluar por ELISA los niveles de TGF β 1. Se muestra la concentración de la citocina en pg/mL en (A) suero, y (B) contenido intestinal. Los datos se muestran en escala lineal, las barras representan la mediana del grupo y las figuras representan los animales controles (círculos azules), animales que recibieron 10^6 UFF/mL (círculos verdes) o 10^7 UFF/mL de RRV (círculos naranjas). Las muestras de suero del día 10 no se incluyeron porque solo se tenían datos de los animales controles, pero no de los animales infectados.

5.2 Efectos del Galunisertib sobre la diarrea en animales infectados con RRV

Con el objetivo de estandarizar la dosis de Galunisertib se realizó un primer experimento, donde se administró a un grupo de ratones ($n=2$) una dosis de 320 μ g/g o una dosis de 720 μ g/g, siguiendo el esquema de tratamiento descrito en la metodología (Tabla 4-2). Se observó que todos los animales que recibieron la dosis de 720 μ g/g, ya sea en forma continua o intermitente, murieron (Figura 5-3), pero no aquellos que recibieron la dosis 320 μ g/g. De tal forma que estos resultados indican que una dosis de Galunisertib de 720 μ g/g una o dos veces al día tiene un efecto letal en ratones neonatos.

Figura 5-3: Curva de Sobrevida de cada grupo a los distintos puntos de tiempo evaluados



Se tuvieron 5 grupos experimentales (ver tabla 4-2), en los cuales se usaron dos ratones C57BL/6 de 4 días de nacidos por grupo. En las primeras 4 condiciones experimentales se administró por vía oral el Galunisertib: 720 μ g/g de forma continua (Grupo 1), 720 μ g/g de forma intermitente (Grupo

2), 320 µg/g de forma continua (Grupo 3), 320 µg/g de forma intermitente (Grupo 4). Finalmente, el último grupo correspondió a los animales controles que recibieron el diluyente del fármaco.

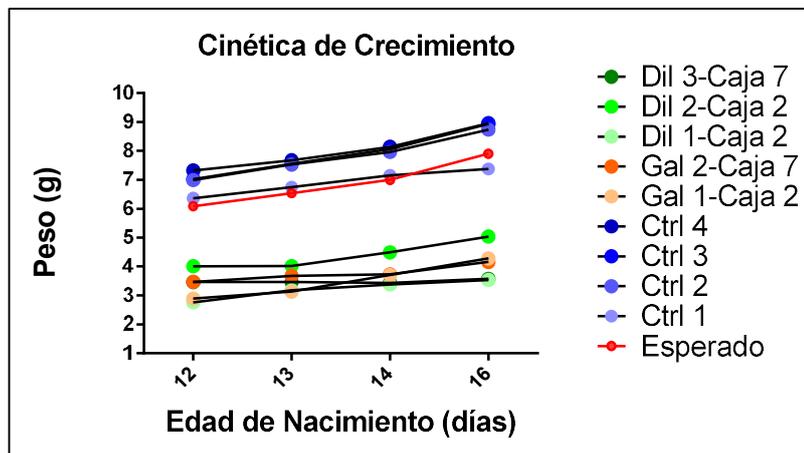
Tomando en cuenta estos datos se concluyó que la dosis de 320 µg/g podría administrarse en un esquema de una o dos veces al día. Sin embargo, para asegurar el bienestar de los animales, debido a que la administración de la dosis dos veces al día podría acercarse a la dosis letal, se seleccionó para el siguiente experimento la dosis de 320 µg/g una vez al día.

Luego se realizó un segundo experimento que tuvo como objetivo evaluar la capacidad del Galunisertib de inhibir la expresión de los genes *serpine1*, *ill11* y *tgfb1* en ratones vacunados con RRV (tratados o no con Galunisertib) o no vacunados (ratones Mock, aquellos inoculados con el sobrenadante de células donde se cultiva el RRV). En resumen, el tratamiento se comenzó al día -1 (ratones de 4 días de edad) por vía oral a la dosis seleccionada previamente (320µg/g). Al siguiente día (Día 0), los grupos correspondientes (Galunisertib, diluyente del Galunisertib y controles) recibieron por vía oral 10^6 UFF/mL de RRV (Grupo Galunisertib y Grupo diluyente) o Mock (Grupo control). Luego, durante 5 días luego de la inoculación con el virus o con Mock se les evaluó la presencia e intensidad de la diarrea. El tratamiento con Galunisertib se continuó administrando en algunos grupos, hasta los días estipulados para la eutanasia de estos (ver tabla 4-4). Las eutanasias se practicaron a los días 1, 2, 3 y 12 posinfección a 3 ratones de cada grupo (sin darles la dosis de inhibidor ese día) para obtener intestino delgado, bazo e hígado para evaluar el ARNm de los genes seleccionados, y además suero y contenido intestinal para evaluar por ELISA los niveles de TGFβ a nivel de proteína.

Todos los animales que conformaron el grupo del día 1, 2 y 3 posinfección tuvieron buena evaluación del bienestar durante el tratamiento, sin embargo, el grupo de ratones que conformó el día 12 (Galunisertib, n=2 y diluyente, n=3) presentaron retraso en el crecimiento a partir del día 8 postratamiento, de tal forma que a partir del día 9 postratamiento se comenzaron a tomar los pesos de los animales de forma individual para poder administrar las dosis exactas del inhibidor. Para poder llevar comparaciones, se tomaron los pesos de los animales del grupo control que seguían el mismo esquema de tiempo pero que no recibieron Galunisertib o diluyente. En la figura 5-4 se presentan los pesos registrados de los ratones de cada grupo, comparado con el peso esperado de los animales de la Unidad de Biología Comparativa de la Pontificia Universidad Javeriana. Se observó que los animales del grupo control tuvieron una cinética de crecimiento muy

similar, lo cual era lo esperado, pero no se observó este mismo comportamiento en los animales que fueron tratados, ya sea con Galunisertib o diluyente. De igual forma, a partir del día 8 postratamiento los animales comenzaron a recibir el Galunisertib o el diluyente de forma intermitente (cada dos días) hasta el día 12 posinfección que culminó el experimento. Estos resultados sugieren que, en el contexto de una infección por rotavirus heterólogo, el diluyente del Galunisertib causa un retardo en el crecimiento en animales neonatos.

Figura 5-4: Cinética de crecimiento de animales infectados o no con RRV y tratados con Galunisertib o diluyente.



Ratones C57BL/6 de 4 días de edad fueron tratados con 320ug/g de Galunisertib en 50µL de diluyente. Al día siguiente los animales de cada grupo fueron infectados con 10^6 UFF/mL de RRV (Dil: Diluyente, n=3 y Gal: Galunisertib, n=2) o Mock (Ctrl: Control, n=4). A partir de los 12 días de nacimiento (9 días postratamiento) se comenzaron a hacer toma de pesos periódicas antes de cada tratamiento con el inhibidor. Se muestra la cinética de crecimiento desde el día 12 al día 16, excluyendo el día 15 donde no hubo registro de los pesos de los animales de la caja 2.

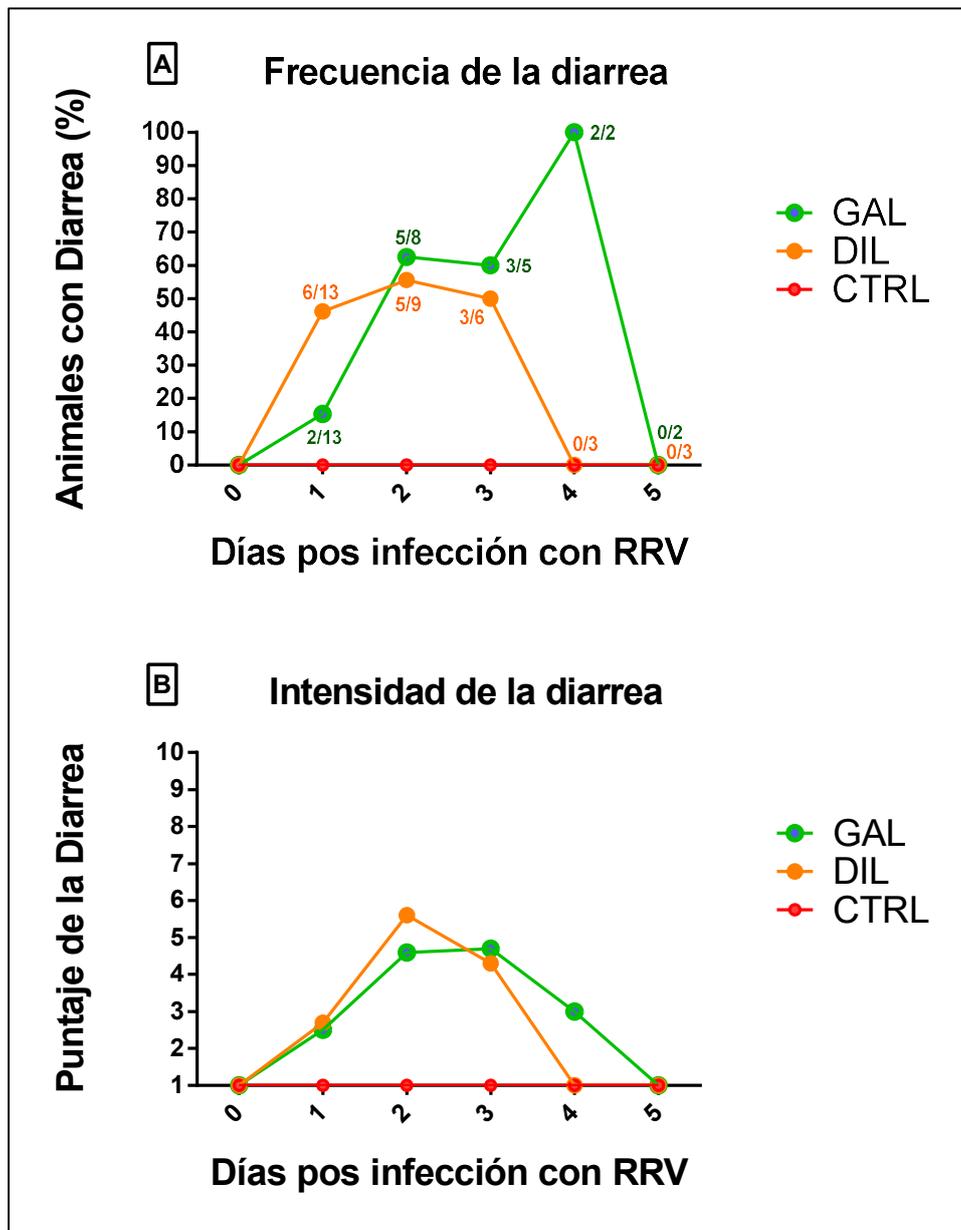
Con respecto al análisis global de la mortalidad, éstas solo se presentaron los primeros tres días de tratamiento. De los animales tratados con Galunisertib, 4 de 15 ratones murieron (26.6%), y de 13 ratones que recibieron el diluyente solo se encontró una mortalidad (7.6%). Sin embargo, al realizar prueba de Fisher no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p=0.333$). De tal forma que no se puede concluir que el Galunisertib causa mortalidad en ratones neonatos infectados con RRV a una dosis de 320

$\mu\text{g/g}$, una vez al día. Además, es importante mencionar que estas mortalidades fueron dadas en los grupos (cajas) de los animales subjetivamente más pequeños de lo esperado, y las dosis dadas estos primeros días no se ajustaron al peso de los ratones, pues como se ha dicho antes, sólo al día 9 luego del tratamiento fue que se comenzaron a ajustar las dosis, de acuerdo con el peso individual de los ratones.

También se estudió el efecto de la inhibición del $\text{TGF}\beta$ en los niveles de diarrea inducidos por la infección por rotavirus. Sólo al día 1 posinfección (Figura 5-5A) se observó una cierta tendencia del Galunisertib para inhibir la diarrea (2 de 13 animales), sin embargo, como en otros experimentos realizados en el laboratorio usando anticuerpos anti- $\text{TGF}\beta$ (Rey et al., 2019), no se encontraron diferencias, cuando se analizaron comparativamente con los animales que recibieron diluyente (6 de 13 animales) (prueba de Fisher $p=0.208$). Al día 4 posinfección todos los animales (2/2) tratados con el Galunisertib presentaron diarrea, comparado con 0 de 3 animales en el grupo diluyente (sin diferencias estadísticas, prueba de Fisher $p=0.428$).

Por otro lado, se evaluó la intensidad de la diarrea (Figura 4B) donde se tomó en cuenta el puntaje promedio de ésta, entre el número total de animales con diarrea, sin encontrar diferencias entre los grupos (prueba de Mann Whitney, $p=0.805$). De manera tal que estos datos sugieren que en el grupo de ratones infectados con RRV y tratados con Galunisertib, la frecuencia de animales que desarrollaron diarrea y los puntajes de intensidad de la diarrea fueron comparables con aquellos animales tratados con el diluyente. Por lo tanto, el Galunisertib usado para inhibir el $\text{TGF}\beta$ no modificó la enfermedad inducida por la infección con RRV.

Figura 5-5: Frecuencia e Intensidad de la Diarrea en animales tratados con Galunisertib



Ratones C57BL/6 de 4 días de edad fueron tratados con 320ug/g de Galunisertib en 50µL de diluyente. Al día siguiente los animales de cada grupo fueron infectados con 10^6 UFF/mL de RRV (DIL: Diluyente y GAL: Galunisertib) o Mock (Ctrl: Control). Luego, durante 5 días (a partir del día 0) se les evaluó la presencia (A) e intensidad de la diarrea (B). Para este experimento se utilizaron 13 animales por grupo que fueron disminuyendo a razón de las eutanasias estipuladas por día de infección. (A) Los números en fracción indica el número de animales con diarrea entre el número total de animales evaluados.

5.3 Evaluación de los niveles de expresión de ARNm y de producción de TGF β en animales infectados con RRV y tratados o no con Galunisertib

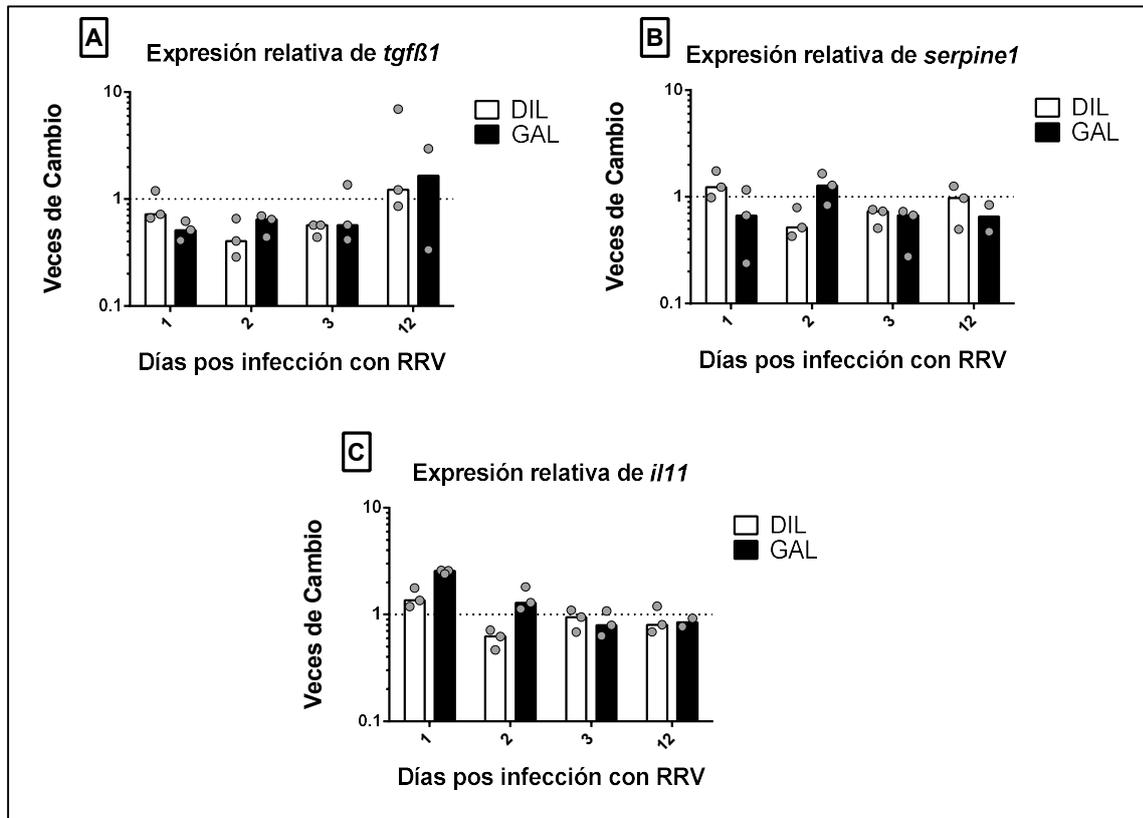
Como última parte de este trabajo se quiso evaluar la capacidad del Galunisertib de inhibir la producción de TGF β 1. En la figura 5-1A se observó que el RRV, en la mayoría de los tiempos evaluados, es capaz de aumentar los niveles del transcrito de *tgfb1* en intestino. Por lo anterior, el siguiente objetivo era confirmar estos resultados y evaluar si en presencia de un inhibidor de la señalización del TGF β 1 con efecto directo en el intestino (Tauriello et al., 2018) se podría revertir este efecto. Y no sólo eso, puesto que el TGF β 1 también modula la expresión de otros genes tales como *Serpine1* e *il11* (Calon et al., 2012) (Tauriello et al., 2018), se quiso evaluar la expresión de estos genes, que podrían ser usados como marcador indirecto del papel del TGF β 1 en inmunomodulación y en particular en nuestro modelo de infección por rotavirus heterólogo.

Como fue descrito en la metodología, ratones neonatos de 5 días de edad fueron infectados con 10⁶ UFF/mL de RRV en presencia o ausencia de Galunisertib. Luego, a los días 1, 2, 3 y 12 posinfección se midió el ARNm en muestras de Intestino. Por otro lado se evaluó la producción de TGF β 1 a nivel de proteína en muestras de suero y contenido intestinal.

Contrario a lo esperado (Figura 5-6A), no se observó incremento en la producción de ARNm de TGF β 1 en los ratones vacunados con RRV y tratados con diluyente, ni inhibición de la expresión de TGF β 1 en el intestino, al tratar con Galunisertib. Tampoco se encontraron diferencias entre los tratamientos con los tres genes evaluados al día 1, 3 y 12 posinfección, mientras que sí se observó una leve disminución de la expresión de ARNm de los tres genes, al día 2 posinfección en animales tratados con el diluyente. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes debido a la gran variabilidad encontrada en los datos y bajo número de ratones.

En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con Galunisertib no tuvo el efecto esperado de inhibición de la expresión de TGF β 1 ni de los genes modulados por esta citocina, a saber *serpine1* e *il11*.

Figura 5-6: Niveles de ARNm de *tgfb1*, *serpine1* e *il11* a distintos puntos de tiempo luego de la infección con RRV en animales tratados o no con Galunisertib



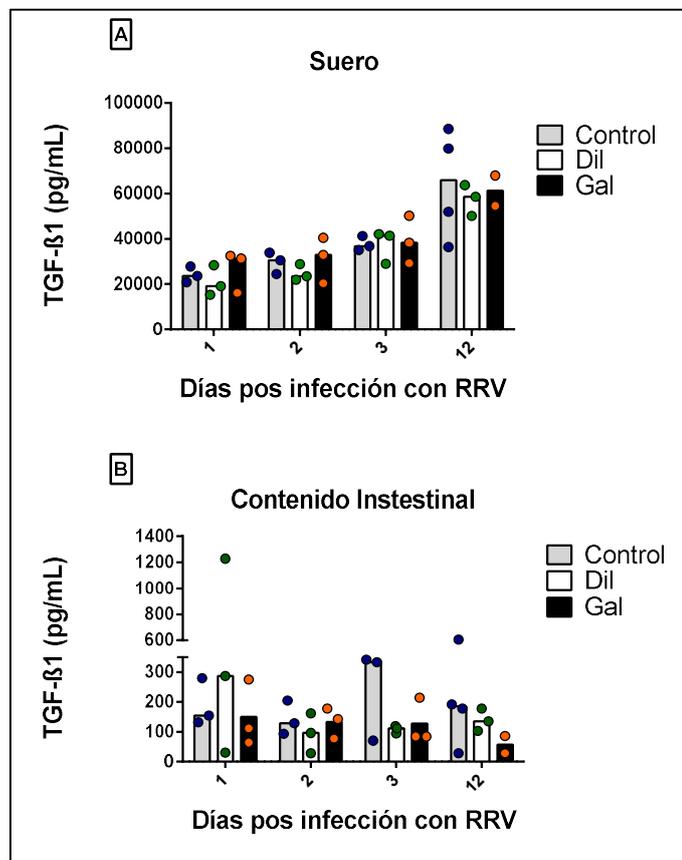
Ratones C57BL/6 fueron vacunados con 10^6 FFU/mL de RRV. A los días 1, 2, 3, y 12 posinfección 1 a 3 ratones de cada grupo (representados en círculos grises) se les practicó eutanasia para obtener intestino para evaluar niveles de ARNm de *tgfbeta1*, *serpine1* e *il11*. El *fold-change* o *veces de cambio* de las muestras de animales infectados fue calculado por el método Pfaffl (Pfaffl, 2001) en comparación con ratones no infectados y utilizando niveles de ARNm de *gapdh* endógenos para la normalización. Se muestra los niveles de ARNm del gen *tgfbeta1* en (A), del gen *serpine1* en (B) y del gen *il11* en (C). Los datos se muestran en escala logarítmica en base 10, las barras representan la mediana del grupo y los valores por encima o por debajo de 1 (línea punteada) indica regulación positiva o negativa del gen, respectivamente.

En muestras de suero de los ratones reportados en la figura 5-7A, los niveles de TGF β 1 fueron comparables entre ratones infectados con RRV (tratados con Galunisertib o Diluyente) y el grupo control Mock. También se observó, especialmente en el grupo control y Diluyente, una correlación positiva entre días posinfección y niveles de TGF β 1, que podría ser proporcional al crecimiento de los ratones.

En el contenido intestinal (Figura 5-7B) se observó, al día 12 posinfección, una leve disminución en los niveles de la citocina en los animales tratados con Galunisertib

(promedio=57, n=2), en comparación con el grupo Diluyente (mediana=135, n=3) y el grupo control (mediana=185, n=4). Sin embargo, los datos de este último grupo presentan mucha variabilidad, por lo que es difícil inferir que hay diferencias entre tratados con Galunisertib y controles, además, el número de animales es pequeño en el grupo Galunisertib. En conclusión, todos estos datos revelan que en muestras de suero y contenido intestinal no detectamos diferencias entre los tratamientos.

Figura 5-7: Niveles de TGFβ1 en suero y contenido intestinal a distintos puntos de tiempo luego de la infección con RRV en animales tratados o no con Galunisertib



Ratones C57BL/6 fueron infectados con 10^6 UFF/mL de RRV. A los días 1, 2, 3 y 12 posinfección 1 a 4 ratones de cada grupo se les practicó eutanasia para obtener suero y contenido intestinal para evaluar por ELISA los niveles de TGFβ1. Se muestra la concentración de la citocina en pg/mL en (A) suero, y (B) contenido intestinal. Los datos se muestran en escala lineal, las barras representan la mediana del grupo y las figuras representan los animales controles (círculos azules), animales que recibieron el diluyente, Dil (círculos verdes) o Galunisertib, Gal (círculos naranjas).

6. Discusión

Con el objetivo de evaluar si la infección con RRV induce TGF β a nivel sistémico e intestinal y si la inhibición del receptor 1 de la citocina con Galunisertib modula los niveles de diarrea inducida por el rotavirus, se infectaron ratones neonatos entre 4 y 7 días de edad con un virus heterólogo de simio (RRV). Básicamente, se realizaron dos tipos de experimentos: El primero consistió en infectar ratones neonatos con dos dosis del virus: 1×10^7 UFF/mL y 1×10^6 UFF/mL; y un segundo experimento que consistió en infectar ratones neonatos con 1×10^6 UFF/mL del virus en presencia o ausencia de Galunisertib (Ver flujograma en Anexo A).

En resumen, con el desarrollo de este proyecto se estableció que:

- Los animales que recibieron RRV, especialmente con la dosis mayor, tuvieron aumento en la expresión del ARNm de *tgfb1* en intestino, pero no en hígado y bazo, además, no presentaron incremento en los niveles de la citocina en suero y contenido intestinal. Lo que sugiere una compartimentalización de la respuesta, pues no se evidenció respuesta a nivel sistémico.
- El diluyente del Galunisertib tuvo un efecto negativo sobre la ganancia de peso. Y, contrario a lo esperado, la expresión de ARNm de *tgfb1* parece disminuir en los animales que recibieron el diluyente.
- El tratamiento con Galunisertib no tuvo el efecto esperado sobre la inhibición de la expresión de TGF β 1 y de los genes modulados por esta citocina, a saber, *serpine1* e *il11*.
- El Galunisertib no tuvo ningún efecto sobre la frecuencia e intensidad de la diarrea inducida por el rotavirus.

La mucosa intestinal tiene un papel muy importante en la defensa contra patógenos intestinales y en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, dado por una combinación entre la microbiota, células epiteliales, tejido linfoide organizado, células

T, células dendríticas y citocinas, que establece un ambiente tolerogénico en el intestino (Rezende & Weiner, 2018). Este ambiente está caracterizado por la producción de citocinas inmunoregulatorias, principalmente TGF β , un importante regulador negativo que, como mostrados en estudios previos usando modelos *in vitro* (L.-S. Rodríguez et al., 2009) (L. S. Rodríguez et al., 2012), podría ser utilizado por el rotavirus para la evasión de la respuesta inmunitaria en su sitio de replicación: el intestino.

En este estudio, se evaluó esta hipótesis usando un modelo de infección por rotavirus en ratones neonatos, que ha sido bien estudiado y que asemeja muy bien la infección en humanos (Burns et al., 1995). Además, ha mostrado ser aplicable al estudio de la enfermedad con cepas no múridas (Uhnnoo et al., 1990). En este modelo se usó un rotavirus heterólogo de simio (RRV), que es idéntico serotípicamente a las cepas de rotavirus humano tipo 3 (G3P[3]) (Mackow et al., 1988) y que ha sido usado como cepa vacunal en humanos (Midthun et al., 1985). Este virus, aunque no produce enfermedad en humanos (Midthun et al., 1985), en ratones produce una leve diarrea que dura de 5 a 6 días (Vancott et al., 2006). Esto sucede porque la mayoría de las cepas heterólogas se replican muy ineficientemente en el intestino de estos animales, y se requiere una dosis de 5 a 6 logaritmos más altos que el virus homólogo a fin de producir diarrea (Uhnnoo et al., 1990). Sin embargo, se ha visto que para que ratones BALB/c puedan ser completamente protegidos, frente a un reto con un virus múrdo, necesitan recibir una dosis de 1×10^7 UFF/mL de RRV por animal (Feng, Burns, Bracy, & Greenberg, 1994). Por lo anterior, en este estudio se decidió comparar ratones infectados con 1×10^6 UFF/mL y 1×10^7 UFF/mL de RRV (Feng et al., 1994).

Luego de administrar 1×10^7 UFF/mL a ratones neonatos se observó, en todos los 13 animales evaluados (Figura 5-1A), una estimulación del ARNm de *tgfb1* en el intestino, lo cual pudiera en cierto modo apoyar la hipótesis de que el RRV induce TGF β 1 en un modelo *in vivo*. Sin embargo, los resultados son un tanto cuestionables porque, en un experimento piloto realizado en el laboratorio, se observó que al usar esta misma dosis en ratones neonatos de 5 a 7 días de edad se produce mortalidad de hasta un 25% un día luego de la infección (Rey, 2018). No obstante, se desconoce la causa de esta mortalidad, porque en otros estudios con ratones neonatos que usa la misma dosis, ya sea en ratones BALB/c a los 7 días de edad (Vancott et al., 2006), o en ratones 129Sv a los 5 días de edad (Feng, Yasukawa, Sen, & Greenberg, 2013) no

se observó este efecto letal. Quizás una de las explicaciones es debida a la atresia biliar producida por RRV, sin embargo, esto solo ha sido observado a días tardíos (7 a 8 luego de la infección) con una dosis de 1.5×10^6 UFF/mL/ratón por vía intraperitoneal en ratones BALB/c infectados a un día de nacimiento (Wang et al., 2011). Además, es importante resaltar que hasta el momento no existen estudios donde hayan utilizado esta dosis en ratones C57BL/6. Por lo tanto, estudios adicionales parecen ser necesarios para determinar la causa de mortalidad en estos ratones.

Ninguno de los animales que recibieron 1×10^6 UFF/mL de RRV presentó mortalidad. Mas aún, se observó que al utilizar 1×10^7 UFF/mL se obtuvo una menor protección (mayor excreción de antígeno viral en materia fecal) frente a un reto con un virus homólogo 12 días luego de la infección, comparado con aquellos que recibieron una dosis baja de 1×10^6 UFF/mL que obtuvieron una protección parcial (Rey, 2018). Estos resultados podrían hacer pensar que, es posible que el aumento en la expresión relativa del transcrito del gen para *tgfb1* haya favorecido una menor protección en los animales infectados con la dosis alta de RRV. A este respecto se decidió usar la dosis de 1×10^6 UFF/mL para los siguientes experimentos.

Según lo predicho por estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio (L.-S. Rodríguez et al., 2009) (L. S. Rodríguez et al., 2012), esta es la primera vez en la literatura que se reporta la inducción de TGFβ1 a nivel de ARNm en un modelo *in vivo* de infección por rotavirus en ratones. Nuestros resultados también parecen concordar con estudios previos en cerdos gnotobióticos inoculados con rotavirus humano, donde se observó aumento significativo en los niveles de TGFβ en muestras de contenido intestinal a partir del día 2 posinfección (F. Liu et al., 2013). Sin embargo, nuestros resultados están en desacuerdo con hallazgos previos en animales BALB/c infectados con una cepa SA11 de rotavirus heterólogo de simio, donde se detectó un decremento en los niveles de expresión relativa del ARNm de *tgfb1* en muestras de yeyuno e íleon (Kawahara et al., 2017). De manera tal que es difícil llegar a una conclusión certera en nuestro modelo, por lo que es necesario realizar más experimentos para corroborar este resultado.

Similar a nuestros resultados con rotavirus, otros autores, en un modelo viral de infección por Influenza, también hallaron la expresión de TGFβ a partir del día 1 posinfección y hasta el día 6 posinfección, donde se observa el pico de expresión (Denney et al., 2018). En nuestro caso el comportamiento parece ser similar, solo que en una forma bifásica de subida y bajada a partir del día 2 (Figura 5-1A), lo que pudiera

coincidir, en cierto modo, con la detección en intestino, de antígeno viral y virus infeccioso descrito por VanCott (Vancott et al., 2006), que también se puede asociar con el pico de diarrea observado al día 2 en este modelo de infección con RRV (Vancott et al., 2006). Es decir, la expresión de ARNm de *tgfb1* en tiempos tempranos luego de la infección puede estar relacionado con aumento en la cantidad de antígeno viral, virus infeccioso y la diarrea. Y aunque el aclaramiento del RRV ocurra a partir de los 5 a 6 días posinfección (Vancott et al., 2006), el TGFβ1 podría mantenerse activo hasta el día 12 posinfección (Figura 5-1A). Esto también se ha reportado en el modelo de infección por Influenza, donde el aclaramiento viral ocurre al día 3 posinfección y, sin embargo, el TGFβ derivado de células epiteliales se sigue liberando en las vías respiratorias por lo menos hasta el día 6 posinfección (Denney et al., 2018).

Partiendo del mismo modelo de infección en neonatos se buscó evaluar los efectos de Galunisertib sobre la diarrea en animales infectados con RRV. Así mismo, se midió el TGFβ a nivel de ARNm y proteína en estos animales tratados o no con el inhibidor. El primer paso fue estandarizar la dosis de Galunisertib que produjera una inhibición eficiente en tejidos intestinales. Basado en la literatura (Tauriello et al., 2018) y por comunicación personal con el mismo autor, se decidió probar dos dosis del inhibidor por vía oral (previamente evaluadas en ratones adultos): Una dosis de 1440mg/Kg/día (720 µg/g) que equivale a nueve veces la dosis en humanos (160mg/día) (Rodon et al., 2015) donde se pueden tener resultados óptimos de inhibición, pero puede generar efectos secundarios; y una segunda dosis más baja de 640mg/Kg/día (320 µg/g) (4 veces la dosis humana) que puede funcionar bastante bien, no parece provocar efectos secundarios y se puede usar para tratamientos prolongados (D. Tauriello, comunicación personal, 25 de marzo de 2018). Atendiendo a estas consideraciones, y tomando en cuenta los resultados encontrados (figura 5-3), se escogió la dosis baja para los siguientes experimentos. Sin embargo, de forma inesperada se observó un efecto negativo en el bienestar de los animales (figura 5-4) a partir del día 8 postratamiento, no por efecto de la dosis usada, sino por efecto del diluyente usado como vehículo. De las evidencias anteriores, este efecto no se había descrito en ratones adultos usando el mismo diluyente (Calon et al., 2012). Sin embargo, hasta la fecha, ningún estudio se ha hecho al respecto usando ratones neonatos. Además, todos los reportes de toxicidad publicados para estos compuestos solo han sido evaluados en animales adultos (Mondal & Yeasmin, 2016) (Nair, 1998) (Cutler,

Collings, Kiss, & Sharratt, 1974). Solo uno se ha publicado (Moore, 1983) de cara a la evaluación de seguridad de lauril sulfato sódico (SLS), donde se encontró efecto negativo en la ganancia de peso en perros cachorros Beagle que recibieron SLS al 2% por vía oral. Sin embargo, en nuestros experimentos se usó una concentración del 0.4%, que está dentro de los parámetros establecidos para la administración oral de forma segura de este agente emulsificante y solubilizante de medicamentos (Medicines Agency, 2015). También se han reportado casos de pérdida de peso en ratas Wistar adultas que recibieron Polivinilpirrolidona (PVP) por vía oral a una concentración del 10% (Nair, 1998). Sin embargo no es razón para tomar algún dato concluyente porque en nuestros experimentos se usó una concentración al 0.085%. De tal forma que es difícil pensar que las concentraciones usadas de cada uno de los componentes del diluyente del Galunisertib hayan producido un bajo bienestar en los animales. Es muy probable que el efecto negativo en la ganancia de peso se deba al efecto combinado de la infección con rotavirus, sumado a la administración del diluyente, de forma que bajo un efecto probablemente sinérgico o aditivo, se potencien los efectos tóxicos de los componentes del diluyente.

Aunque no se han reportado efectos negativos sobre la ganancia de peso con el uso de Carboximetilcelulosa (CMC) (uno de los componentes del diluyente), si se han reportado cambios fisiológicos en el intestino delgado al administrar este agente emulsificante a concentraciones del 2% (Swidsinski et al., 2009), muy cercana a la usada en nuestro estudio (1%). Estos investigadores encontraron que CMC induce el sobrecrecimiento bacteriano y la inflamación del intestino delgado en animales susceptibles (Swidsinski et al., 2009). Esto en cierto modo podría explicar los efectos inesperados del diluyente sobre la expresión de ARNm de *tgfβ1*, *serpine1* e *il11* (figura 5-6), ya que en un contexto inflamatorio de este tipo se puede romper la tolerancia inmune (Rezende & Weiner, 2018), y de hecho se ha visto que en enfermedad intestinal inflamatoria hay defectos en la señalización TGFβ1/Smad debido a la alta expresión de Smad7, un inhibidor de la actividad de TGFβ1 (Troncone, Marafini, Stolfi, & Monteleone, 2018). Lo que quizás pudiera explicar la regulación negativa de esta citocina, observada en algunos animales (Figura 5-6A).

Finalmente, aunque en nuestro estudio no se observaron diferencias entre los grupos de tratamiento (Control, Diluyente y Galunisertib) (figura 5-5 y 5-7) si se reprodujo el modelo murino de infección por rotavirus heterólogo, encontrando

características similares a lo reportado por otros autores (Vancott et al., 2006) y por resultados previos de nuestro grupo (Rey, 2018).

Una de las limitaciones de nuestro trabajo es el bajo número de ratones analizados en los estudios con Galunisertib. Esto se debe al efecto adverso presentado con el diluyente: cuando se planearon los experimentos se esperaba repetir cada experimento tres veces con el fin de evaluar la reproducibilidad de los hallazgos y obtener un número de resultados suficientes, para ser analizados mediante estadísticas no paramétricas. Dado que los ratones tuvieron retardo del crecimiento no hay razón para repetir los experimentos y debemos analizar los resultados de la mejor manera para avanzar en el entendimiento del modelo. No obstante, tenemos algunos indicios de la confiabilidad de algunas medidas.

Como parte anexa de este trabajo de grado se verificó el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-TGF β en muestras de suero de animales infectados con RRV y tratados o no con el anticuerpo, encontrando una disminución significativa ($p < 0,0003$) de 7,4 veces en los niveles medios de TGF β (activado con ácido), en comparación con los ratones tratados con control isotipo, 12 días después de la infección (Rey et al., 2019), lo que sugiere que los niveles detectados de TGF β en suero son confiables. Estos resultados forman parte del artículo que, recientemente, ha sido evaluado y aceptado en Journal of Virology (ver anexo I).

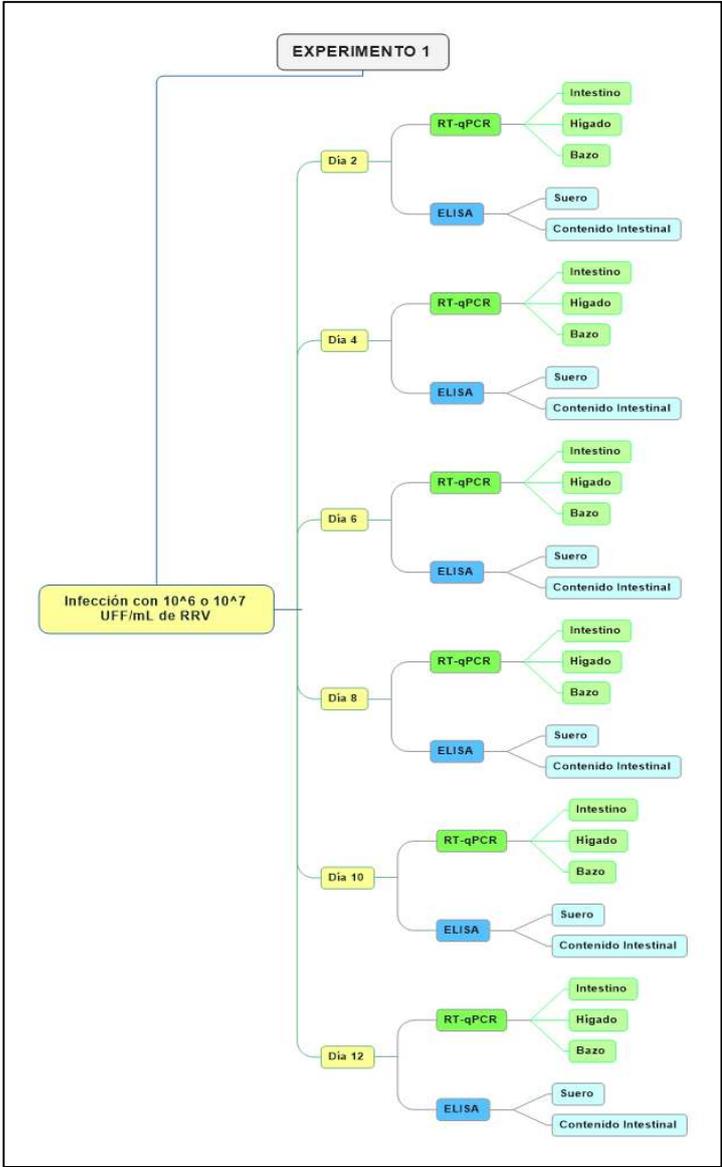
6.1 Conclusiones

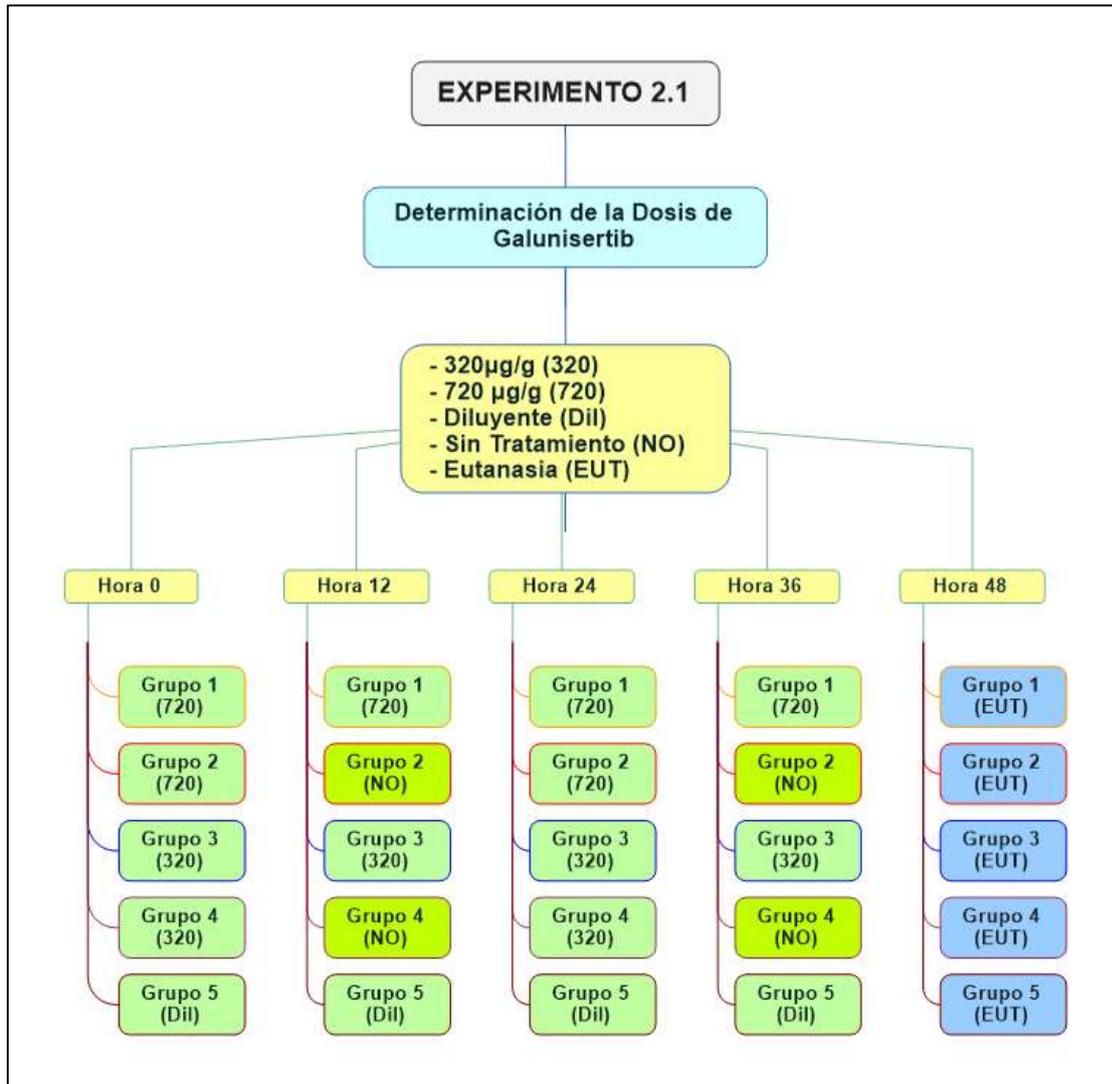
- I. Usando un modelo múrdo neonatal de infección con un virus heterólogo de simio (RRV) se demostró que una dosis de 10^7 UFF/mL y, en menor medida, una dosis de 10^6 UFF/mL del virus indujo el ARNm de *tgfb1* en el intestino, lo que apoya la hipótesis de que el rotavirus induce TGF β 1 en un modelo *in vivo*.
- II. El uso de un inhibidor de la vía de señalización del receptor 1 de TGF β 1 (Galunisertib) con efecto directo en el intestino no modificó los niveles de diarrea inducida por RRV.
- III. El diluyente del Galunisertib en el contexto de vacunación con RRV tiene un efecto sobre el bienestar de los ratones neonatos y parece tener un efecto sobre la expresión de los genes que son regulados por el TGF β 1, lo que no permite concluir sobre el efecto del inhibidor.

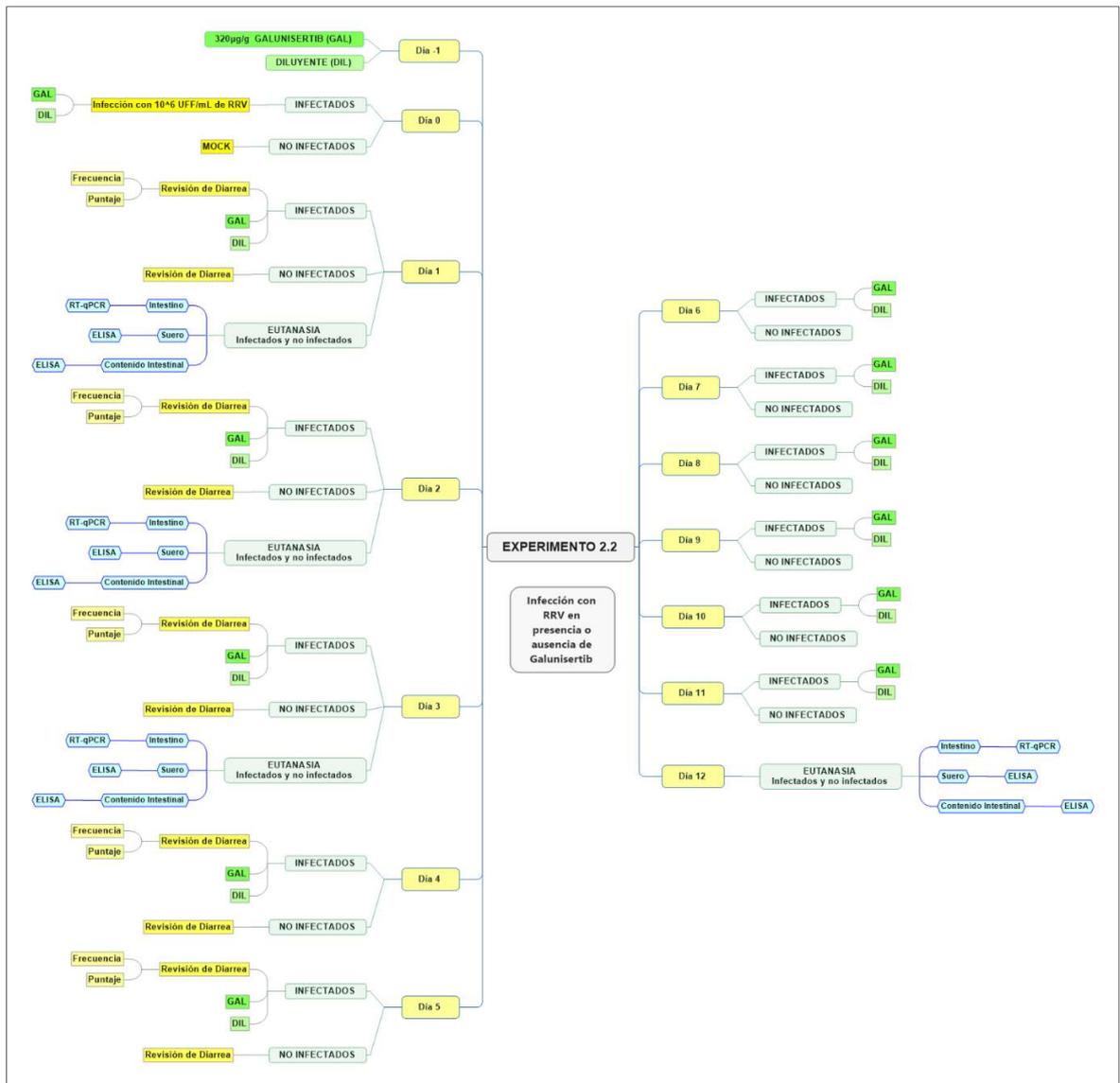
6.2 Recomendaciones

- I. En este estudio se esperaba que los resultados de expresión de ARNm de TGB1 en intestino, se confirmaran con el segundo experimento en animales que no recibieron Galunisertib, sin embargo, resultó que el diluyente usado como vehículo influyó en la respuesta. Para poder concluir de manera certera (con pruebas estadísticas) que a la dosis de 10^6 FFU/mL de RRV se induce ARNm de TGF β 1, se deben realizar más experimentos, especialmente en los días tempranos posinfección.
- II. Para evitar los efectos producidos por el diluyente se recomienda cambiar algunos componentes por otros más seguros que también han sido usados como vehículo del Galunisertib (Holmgaard et al., 2018) (Kelly M Credill, 2014). De tal forma que una fórmula recomendada podría ser la siguiente: 1% Hidroxietilcelulosa (HEC), que funcionaría como estabilizante de emulsión, similar a CMC (CIR Expert Panel, 1986); 0.25% Polisorbato 80 (Tween 80) ampliamente usado en preparaciones farmacéuticas como emulsionante, dispersante o estabilizante (National Toxicology Program, 1992); y 0.05% del antiespumante (Antifoam A Sigma o Dow Corning® Antifoam 1510-US).

A. Anexo: Diagrama de flujo de experimentos realizados







B. Anexo: Protocolo de semipurificación de RRV por colchón de sacarosa

Día 1:

1. Pelletear el virus así: Pasar el sobrenadante a tubos Nalgene (25x89mm Ref. 3430-2526), poniendo 25 ml del sobrenadante por tubo (500mL/25tubos: salen 20 tubos APROX). Se debe colocar el 75% del contenido total, es decir aprox. 18.75mL.
2. Pesar los tubos con el sobrenadante haciendo parejas con pesos similares, máximo con dos decimales de diferencia.
3. Colocar los primeros 200 mLs (25mL*8 tubos) en rotor 70Ti de ángulo fijo (ultracentrifuga Beckman) y centrifugar a 40000 rpm (170400g) durante 1hora 30 min. (peleteado).
4. Al sacar de la centrifuga, verificar la presencia del pellet y delinearlo con marcador.
5. Tomar el sobrenadante y descartarlo. Resuspender el pellet en el menor volumen posible (200 – 500µL) de medio de cultivo DMEM y dejar en los tubos.
6. Agregar otros 200mLs de sobrenadante en los mismos 8 tubos y centrifugar a 40000 rpm (165000g) durante 1hora 30 min. Resuspender el pellet en el menor volumen posible (200 – 500µL) y dejar en los tubos.
7. De los 8 tubos que salieron en la segunda ronda, descartar el sobrenadante, resuspender extensamente el pellet de 4 de ellos y agregárselo a los otros 4. Se debe reducir el número de tubos a 4 porque el volumen de los tubos debe estar a un 75-80% porque si no se dañan.
8. Agregar los 100mLs restantes de sobrenadante repartidos en estos 4 tubos y centrifugar a 40000 rpm (165000g) durante 1hora 30 min.
9. Resuspender extensamente los 4 pellets, primero en con un 1 mL de medio de cultivo DMEM y luego en 3 mL (en total 4 mL) por tubo y combinar todos los sobrenadantes y llevar a volumen final de 19 mL.
10. Almacenar el medio con virus a 4°C hasta el día siguiente. No congelar.

DIA 2:

11. Agregar aproximadamente 9.5 mL del sobrenadante viral en 2 tubos para rotor basculante SW41. Es importante guardar 200µL antes del procedimiento.

12. Posteriormente, agregar lentamente, 1.5 mL de sacarosa al 40% en buffer TNC (Tris 10mM, NaCl 100mM, CaCl₂ 2 mM) teniendo en cuenta de no mezclar las 2 fases.
13. Colocar los tubos en las camisas para rotor SW41 (basculante) y centrifugar a 27000 rpm (124700g) a 4°C durante dos horas. Este procedimiento se realiza en la ultracentrífuga L-70 de Beckman Coulter
14. Decantar el sobrenadante tratando de dejar los más seco posible el tubo. (nota: Si se van a realizar varias centrifugaciones no es necesario recuperar el pellet ya que los tubos se pueden usar hasta 3 veces).
15. Agregar 100µL de buffer de TNC a cada tubo y cubrir con parafilm. Dejar a 4°C hasta el día siguiente.

DIA 3:

16. Resuspender extensamente y pasar el contenido a un eppendorf estéril y mantenerlo en frío. Lavar extensamente cada tubo con otros 100µL de buffer de TNC y agrupar todos estos medios en el mismo eppendorf (volumen total aproximadamente 400µL).
17. Homogenizar extensamente y hacer aproximadamente 8 alícuotas de 50µL y congelar a -70°C. También guardar dos pequeñas alícuotas de 10uL.

C. Anexo: Protocolo de cuantificación de RRV por inmunocitotinción

Cultivo de células

1. Preparar medio de cultivo DMEM (Gibco; no de catálogo 11960-051) con 10% de suero fetal bovino (SFB) (suplementado con penicilina-estreptomina 1X y HEPES (Gibco; no de catálogo 15630) y glutamax (Gibco; no de catálogo 35050061) al 1%
2. Descongelar células MA104. Utilizar el baño serológico a 37°C.
3. Lavar las células con el medio de cultivo precalentado. Para esto centrifugar a 1400 rpm durante 10 minutos.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet con 5 mL de medio de cultivo con SFB.
5. Agregar las células a un frasco T25 a 37°C con 5% de CO₂ y dejar hasta el día siguiente.

Pase o expansión de células

6. Pasado el tiempo de incubación, cuando se observa una confluencia de más del 80%, retirar el medio del frasco.
7. Con el objetivo de eliminar el SFB que puede inactivar la acción de la tripsina, se debe lavar con PBS 1X (Gibco; no de catálogo 14200-075). Girar suavemente el frasco para retirar las células muertas. Descartar el PBS.
8. Preparar Tripsina-EDTA 1X y agregar 1mL por cada frasco T25, incubar a 37°C por 5 minutos
9. Golpear el frasco para ayudar a despegar las células adheridas e incubar por otros 5 minutos a 37°C.
10. Retirar la suspensión celular y sembrar 0.2mL en un frasco nuevo T25 con 5mL de medio DMEM con 10% SFB (suplementado con penicilina-estreptomina 1X y HEPES (Gibco; no de catálogo 15630) y glutamax (Gibco; no de catálogo 35050061) al 1%.
11. Si se requiere congelar células tomar 0.8mL de la suspensión y adicionar en dos crioviales con 1mL de medio de congelación (Preparar 3mL de SFB con 10% de DMSO)

Cultivo en placas

12. Luego de tres pases celulares, se debe retirar el medio de cultivo y se subcultivan las células en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning Costar, 3595)
13. Agregar 250 μL de la suspensión celular de un frasco T25 a 20 mL de medio DMEM 8% SFB, y distribuir 200 μL por pozo en una placa de 96 pozos de fondo plano.
14. Incubar a 37°C, 5% de CO_2 .

Infección con RRV

NOTA: Se tendrán dos placas: 1) placa de fondo plano para para las células en cultivo y 2) placa de fondo en U (Becton Dickinson, 353077) para hacer las diluciones de los virus.

15. Activar el virus *in vitro* 30 minutos a 37°C con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tripsina que debe ser diluida a dicha concentración a partir de la concentración inicial del stock (almacenada a -70°C).
16. NOTA: Se usarán tres condiciones del virus: 1) Virus (Control Positivo): Se usará un virus que ya se tenga titulado con concentración conocida (sobrenadante usado para los experimentos): Se deben activar 30 μL . 2) Virus antes del colchón de sacarosa: Se pueden activar 30 μL . 3) Virus después del colchón de sacarosa: Como este virus se tiene poco se debe activar menos: Se pueden activar 30 μL , tomando 3 μL del stock en 30 μL de medio DMEM.

Y si es por duplicado simplemente usar el doble.

17. Durante este tiempo se alista la placa para realizar las diluciones del virus adicionando (con pipeta multicanal) 120 μL a cada pozo de medio DMEM (suplementado con penicilina-estreptomicina 1X y HEPES (Gibco; no de catálogo 15630) y glutamax (Gibco; no de catálogo 35050061) al 1%.

NOTA: Se agregan 120 μL para poder luego agregar 30 μL del virus y alcanzar una dilución 1/5. Sin embargo si se van a realizar diluciones mayores, por ejemplo, 1/10 se debe agregar 135 μL del medio y 15 μL del virus.

18. Después de observar una capa confluyente de células, se debe lavar la placa 3 veces con 200 μL por pozo con medio DMEM libre de SFB y precalentado a 37°C.
19. Dejar en incubación (37°C 5% CO_2) las células con 200 μL de medio DMEM sin suero, mientras se hacen las diluciones del virus.
20. En una placa de fondo en U realizar diluciones seriadas de cada una de las condiciones de virus a usar: 1) Del virus control positivo, como se tiene suficiente realizar diluciones seriadas 1/5 (150/5=30 μL) (desde 1/5 hasta 1/390625). 2) Del virus pre-purificado realizar diluciones a partir de 1/5 (150/5=30 μL). 3) Del virus purificado partir de una concentración 1/10.
21. Luego de realizar las diluciones, sacar las células de la incubadora, se retiran los 200 μL que se añadieron del medio, y posteriormente se añaden (de acuerdo con el mapa establecido) 100 μL de cada dilución realizada del virus. De esta manera las células quedaran infectadas.

22. Incubar la placa a 37°C, 5% de CO₂ durante 16 horas.

Coloración

23. Luego del tiempo de incubación, retirar el medio cuidando de no llevarse la monocapa.
24. Lavar las células con 200 µL por pozo de PBS 1X precalentado a 37°C.
25. Retirar el PBS 1X y adicionar 70 µL por pozo de metanol frío para fijar las células. Dejar 20 minutos a temperatura ambiente.
26. Posteriormente, lavar con PBS 1X y adicionar 70 µL anti RV-GP965 a una dilución 1/4000 en PBS 1X+0,1% de albúmina de sérica bovina. Incubar a 37°C por 45 minutos.
27. Lavar con 200 µL por pozo usando PBS 1X
28. Adicionar 70 µL de anti-GP-biotina (Ref. BA-7000 vector labs) diluido 1/2000 en PBS 1X+0,1% de albúmina de suero bovina.
29. Incubar a 37°C por 45 minutos.
30. Lavar con 200 µL por pozo usando PBS 1X
31. Adicionar 70 µL de estreptavidina-peroxidasa (KPL; no de catálogo 141801) diluida 1/1000 en PBS 1X 1X+0,1% de albúmina de suero bovina.
32. Incubar a 37°C por 45 minutos.
33. Lavar con 200 µL por pozo usando PBS 1X
34. Adicionar 50 µL por pozo de AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole) (VECTOR; no de catálogo SK-4200). Preparación: Medir 5 ml de agua destilada. Adicionar 2 gotas de buffer, 3 gotas de AEC y 2 gotas de peróxido de hidrógeno. Agitar después de adicionar cada reactivo.
35. Mirar al microscopio la formación de focos rojos en el control positivo.
36. Después de 10 a 15 minutos parar la reacción con agua de la llave.
37. Para cuantificar las unidades formadoras de foco, contar los puntos rojos (focos) observados en las filas G o H (correspondientes a las diluciones 1/78125 y 1/390625) y multiplicarlos por el factor de dilución. Ese valor será la concentración de virus correspondiente en 100 µL que se sembraron. Luego se debe multiplicar por 10 para que quede a la concentración de UFF/mL.

D. Anexo: Protocolo de ELISA tipo sandwich de TGF β 1

Materiales

1. Kit de ELISA DuoSet Mouse TGF- β 1 (Cat. DY1679)
2. Buffer de lavado (0.05% Tween 20 en PBS)
3. Buffer de bloqueo (5% Tween 20 en PBS):
4. Reactivo de dilución (1.4% SFB delipidizado con 0.05% Tween 20 en PBS, pH 7. Filtrado con membranas de 0.2 μ m)
5. Anticuerpo de captura (Mouse TGF- β 1 Capture Antibody, 480 μ g/mL):
6. Curva estándar (Mouse TGF- β 1 Standard, 120ng/mL).
7. Anticuerpo de detección (Biotinylated chicken anti-TGF- β 1 antibody, 4.5 μ g/mL):
8. Estreptavidina-HRP (streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase):
9. Solución substrato 1:1 de Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂ 0.02%, KPL Peroxidase Substrate Solution B, Cat. 5120-0037) y Tetrametilbenzidina (0.4g/L TMB, KPL Peroxidase Substrate Solution A, Cat. 5120-0048).
10. Solución Stop (2N de Ácido Sulfúrico (H₂SO₄))
11. Buffer de extracción para muestras de contenido intestinal (BSA 250mg, NaCl 1.17g, EDTA 18.6mg, Tween-20 25 μ L, PBS 1X csp 50mL)

Día 1

Procedimiento: Anticuerpo de captura

1. Diseño de la placa
2. Cubrir la placa de ELISA con 100 μ L/pozo del anticuerpo de captura a una concentración de trabajo de 4 μ g/mL en PBS estéril 1X.
3. Sellar la placa con película transparente autoadherente.
4. Incubar toda la noche a temperatura ambiente.

Día 2

Procedimiento: Bloqueo

5. Descartar el sobrenadante.
6. Realizar 3 lavados con 400 μ L de buffer de lavado.

7. Luego del último lavado se debe secar bien la placa con ayuda de toallas de papel, removiendo cualquier remanente de buffer de lavado.
8. Bloquear cada pozo con 300µL de Buffer de bloqueo.
9. Incubar a 37°C durante mínimo 1 hora.
10. Realizar 3 lavados con 400µL de buffer de lavado.

Procedimiento: Preparación de la Muestra (Suero)

11. El kit recomienda usar diluciones 1/60. Sin embargo si las muestras están resuspendidas 1/2 en glicerol se debe realizar una dilución 1/30.
12. El kit recomienda activar con HCl a una dilución 1/4.
13. Se pueden tomar 8.3µL de muestra y se activan 6µL
14. Añadir 1.5µL de 1N HCl
15. Mezclar bien.
16. Incubar 10min a temperatura ambiente.
17. Para neutralizar la mezcla, añadir 1.5µL de 1.2 N NaOH.
18. Mezclar bien.
19. Antes de agregar la muestra hacer una dilución 1/60 o 1/30 en reactivo de dilución.

Procedimiento: Preparación de la Muestra (Contenido Intestinal)

20. Pesar el órgano con el contenido intestinal
21. Agregar 1mL de buffer de extracción por cada 100mg de peso del órgano
22. Luego agregar el volumen de coctel de inhibidores (Sigma P8340-5ML) a una concentración final del 1% (1µL por cada 100µL) en el volumen de buffer agregado.
23. Homogeneizar el tejido con Tissue Tearor (985-370)
24. Centrifugar a 4650g por 10 minutos a 4°C
25. Tomar el sobrenadante y trabajar con la muestra sin diluir. En todo caso, si hay muy poca muestra diluirla 1/2 y luego establecer al final un factor de dilución. En este caso, 2.

Procedimiento: Adición de la muestra o curva estándar.

26. Realizar 7 puntos de la curva haciendo diluciones seriadas 1/2 a partir de una concentración stock inicial de 2ng/mL. Aunque el límite de detección del ensayo es 31.3pg/mL se usa un punto menor a este como control negativo (15.65pg/mL)
27. Sembrar las muestras preparadas (en duplicado) o curvas estándar añadiendo 100µL/pozo.
28. Sellar la placa con película transparente autoadherente.
29. Incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
30. Descartar el sobrenadante.
31. Realizar 3 lavados con 400µL de buffer de lavado.
32. Luego del último lavado se debe secar bien la placa con ayuda de toallas de papel, removiendo cualquier remanente de buffer de lavado.

Procedimiento: Adición de Anticuerpos de detección y Revelado

33. Diluir en reactivo de dilución el anticuerpo de detección a una concentración de trabajo de 75ng/mL.
34. Cubrir la placa de ELISA con 100µL/pozo del anticuerpo detección diluido.
35. Sellar la placa con película transparente autoadherente
36. Incubar a temperatura ambiente por 2 horas
37. Descartar el sobrenadante
38. Realizar 3 lavados con 400µL de buffer de lavado
39. Luego del último lavado se debe secar bien la placa con ayuda de toallas de papel, removiendo cualquier remanente de buffer de lavado.
40. Agregar 100µL por pozo de Estreptavidina-HRP
41. Sellar la placa con película transparente autoadherente
42. Incubar a temperatura ambiente por 20 minutos (Evitar colocar la placa a la luz directa)
43. Descartar el sobrenadante
44. Realizar 3 lavados con 400µL de buffer de lavado
45. Luego del último lavado se debe secar bien la placa con ayuda de toallas de papel, removiendo cualquier remanente de buffer de lavado.
46. Agregar 100µL por pozo de Solución Sustrato
47. Incubar a temperatura ambiente por 20 minutos (Evitar colocar la placa a la luz directa)
48. Detener la reacción agregando 50µL por pozo de solución Stop (Golpear suavemente la placa)
49. Realizar la lectura en un lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

E. Anexo: Preparación y cálculos de dosis de Galunisertib

Materiales

1. **Galunisertib LY2157299 (Shangai BiochemPartner CAS 700874-72-2) (3 gramos):** Pureza del 98% con la fórmula C₂₂H₁₉N₅O.
2. **Carboxymethylcellulose sodium salt low viscosity (SIGMA Ref. C5678) 500G:** Es un derivado de celulosa (polímero de beta- (1,4) -D-glucopiranososa) que ayuda a modificar y estabilizar la viscosidad de una emulsión (De Santis et al., 1970). En nuestro caso se usará la carboximetilcelulosa de baja viscosidad para hacer que la solución tenga la consistencia de solución acuosa fina (Merck, 2018b). MSDS: No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento (CE) No. 1272/2008. Sin embargo, si hay contacto con los ojos o con la piel, se debe lavar con abundante agua.
3. **Polyvinylpyrrolidone K90 (SIGMA Ref. 81440) 250G:** Es un polímero de vinilpirrolidona, higroscópico, amorfo y soluble en agua y en solventes orgánicos (Ashland, 2013). Este compuesto es uno de los tres principales excipientes farmacéuticos nuevos que puede usarse como codisolvente. En nuestro caso la polivinilpirrolidina (PVP) K90 se usará para evitar la formación de agregados, mejorar la disolución y la biodisponibilidad del Galunisertib (poco soluble) (Chemical Book, 2017). MSDS: No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento (CE) No. 1272/2008. Sin embargo, si hay contacto con los ojos o con la piel, se debe lavar con abundante agua.
4. **Antifoam A concentrate aqueous emulsion for bacterial and mammalian systems (SIGMA Ref. A6582) 100G:** Antiespumante A es un producto a base de silicona utilizado para prevenir o minimizar la formación de espuma tanto en sistemas de fermentación microbiana como en cultivos de suspensiones celulares de mamíferos (Merck, 2018a). En nuestro caso se usará para evitar la formación de espumas en el fármaco diluido. MSDS: No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento (CE) No. 1272/2008. Sin embargo, puede ser ligeramente peligroso al contacto con la piel y ojos (irritante). Si hay contacto con los ojos o con la piel, se debe lavar con abundante agua.
5. **Sodium dodecyl sulfate BioReagent, suitable for electrophoresis, for molecular biology, ≥98.5% (GC) (SIGMA Ref. L3771) 100G:** También

conocido como lauril sulfato sódico (SLS, del inglés *sodium lauryl sulfate*). Es un detergente aniónico, que en nuestro caso se usará como agente de solubilización de lípidos (Merck, 2003). MSDS: Es un sólido inflamable, nocivo en caso de ingestión o inhalación, provoca irritación cutánea, lesiones oculares graves, irritación de las vías respiratorias. En caso de contacto con los ojos lavar con abundante agua. Asistir a un centro de atención.

Procedimiento (Cálculo de Galunisertib según el número de ratones):

1. Calcular la cantidad total de Galunisertib (GAL) a usar. En el experimento de estandarización de administración del GAL se van a administrar dos dosis, una de 720µg/g y otra de 320µg/g. En la tabla 1, se resume el esquema de tratamiento.
2. Cada 48 horas preparar una suspensión fresca del producto (*según recomendaciones de Tauriello, Dr Daniele Tauriello Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), comunicación personal*).
3. En la tabla 2 se resume la dosis total en µg o gramos a administrar de GAL tomando en cuenta el peso de los animales en cada tratamiento.

			720µg/g (720mg/Kg)		320µg/g (320mg/Kg)	
Edad del ratón	Tiempo Tratamiento	Peso (g)	Dosis total a administrar por ratón (µg)	Dosis total a administrar por ratón (mg)	Dosis total a administrar por ratón (µg)	Dosis total a administrar por ratón (mg)
5 días	0 horas	2,9063	2092 ^a	2,0925	930 ^b	0,9300
5 días	12 horas	2,9063	2092	2,0925	930	0,9300
6 días	24 horas	3,3608	2419 ^c	2,4119	1075 ^d	1,0754
6 días	36 horas	3,3608	2419	2,4119	1075	1,0754

Tabla 2. Cálculo de dosis de Galunisertib. ^a Dosis en microgramos a los 5 días de edad con Dosis alta (720µg/g*2,9063g PV = 2092µg, que equivale a 2.09mg). ^b Dosis en microgramos a los 5 días de edad con dosis baja (320µg/g*2,9063g PV = 930µg, que equivale a 0,93mg). ^c Dosis en microgramos a los 6 días de edad con dosis alta (720µg/g*3,3608g PV = 2419µg, que equivale a 2.41mg). ^d Dosis en microgramos a los 6 días de edad con dosis baja (320µg/g*3,3608g PV = 1075µg, que equivale a 1,07mg).

4. En las siguientes tablas (3.1, 3.2, 3.3 y 3.4) se resume la dosis total en miligramos a administrar por animal (se multiplica por 2, porque son dos animales por grupo), y la cantidad total de GAL que se debe diluir en el volumen de diluyente correspondiente.

0 HORAS					
Dosis Alta: 720µg/g (720mg/Kg)			Dosis baja: 320µg/g (320mg/Kg)		
Grupo	Gramos a administrar / volumen de diluyente	Vía	Grupo	Gramos a administrar / volumen de diluyente	Vía
1 (2 animales)	4,18mg en 100µL	Oral	1 (2 animales)	1,86mg en 100µL	Oral
2 (2 animales)	4,18mg en 100µL	Oral	2 (2 animales)	1,86mg en 100µL	Oral
2 animales extras	4,18mg en 100µL	-	2 animales extras	1,86mg en 100µL	-
Total	12,56mg/300µL		Total	5,58mg/300µL	
Total de GAL a usar: 18,14mg					

Tabla 3.1. Dosis total a administrar de GAL a las 0 horas.

12 HORAS					
Dosis Alta: 720µg/g (720mg/Kg)			Dosis baja: 320µg/g (320mg/Kg)		
Grupo	Gramos a administrar / volumen de diluyente	Vía	Grupo	Gramos a administrar / volumen de diluyente	Vía
1 (2 animales)	4,18mg en 100µL	Oral	1 (2 animales)	1,86mg en 100µL	Oral
2 (2 animales)	No recibe	Oral	2 (2 animales)	No recibe	Oral
2 animales extras	4,18mg en 100µL	-	2 animales extras	1,86mg en 100µL	-
Total	8,37mg/200µL		Total	3,72mg/200µL	
Total de GAL a usar: 12,09mg					

Tabla 3.2. Dosis total a administrar de GAL a las 12 horas.

24 HORAS					
Dosis Alta: 720µg/g (720mg/Kg)			Dosis baja: 320µg/g (320mg/Kg)		
Grupo	Gramos a administrar /	Vía	Grupo	Gramos a administrar /	Vía

	volumen de diluyente			volumen de diluyente	
1 (2 animales)	4,82mg/100µL	Oral	1 (2 animales)	2,14mg/100µL	Oral
2 (2 animales)	4,82mg/100µL	Oral	2 (2 animales)	2,14mg/100µL	Oral
2 animales extras	4,82mg/100µL	-	2 animales extras	2,14mg/100µL	-
Total	14,52mg/300uL		Total	6,45mg/300uL	
Total de GAL a usar: 20,97mg					

Tabla 3.3. Dosis total a administrar de GAL a las 24 horas.

36 HORAS					
Dosis Alta: 720µg/g (720mg/Kg)			Dosis baja: 320µg/g (320mg/Kg)		
Grupo	Gramos a administrar / volumen de diluyente	Vía	Grupo	Gramos a administrar / volumen de diluyente	Vía
1 (2 animales)	4,82mg/100µL	Oral	1 (2 animales)	2,14mg/100µL	Oral
2 (2 animales)	No recibe	Oral	2 (2 animales)	No recibe	Oral
2 animales extras	4,82mg/100µL	-	2 animales extras	2,14mg/100µL	-
Total	9,68mg/200µL		Total	4,30mg/200µL	
Total, de GAL a usar: 13,98mg					

Tabla 3.4. Dosis total a administrar de GAL a las 36 horas.

- Si se suman todos los totales, se deberían pesar aproximadamente 65,18mg de Galunisertib.
- Se debe preparar una concentración stock del Galunisertib, que será la dosis más alta de los tratamientos para un ratón: 2.41mg/50µL. Del este stock realizar las otras concentraciones.
- Entonces: 2,41mg en 50µL; 62,18mg serán: 1346,77uL (62,18mg*50µL/2,41mg). Estar pendiente, por si en el momento de pesar se excede lo deseado, realizar el cálculo nuevamente tomando en cuenta el nuevo peso.
- En resumen (stock): Pesar 62,18mg de Galunisertib y diluir en 1346,77uL (Ver resumen en las siguientes figuras)

Edad del Ratón	Peso (g)	Dosis Alta (ug/g)	Dosis Baja (ug/g)			
5 días	2,91	720,00	320,00			
6 días	3,36					
		Hora 0	Hora 12	Hora 24	Hora 36	Totales
DOSIS ALTA	Dosis de GAL por animal (mg)	2,09	2,09	2,42	2,42	65,18
	Animales a usar (Unidad)	6	4	6	4	
	Total (mg)	12,56	8,37	14,52	9,68	
DOSIS BAJA	Dosis de GAL por animal (mg)	0,93	0,93	1,08	1,08	20,05
	Animales a usar (Unidad)	6	4	6	4	
	Total (mg)	5,58	3,72	6,45	4,30	
		18,14	12,09	20,97	13,98	

Stock GAL (a partir de dosis alta: 2,42mg)	Dosis Más Alta (mg)	Volumen de bolo por animal (uL)	Total GAL (mg)	Volumen de Diluyente (uL)
	2,42	50	65,18	1346,77

Horas del Trat.	Dosis Alta				Dosis baja				Total Calculado o Stock (uL)
	Del stock (uL)	Totat del stock para todo el tratamiento (uL)	Volumen en Inyectadora (uL)	Volumen a Completar de Diluyente (uL)	Del stock (uL)	Totat del stock para todo el tratamiento (uL)	Volumen en Inyectadora (uL)	Volumen a Completar de Diluyente (uL)	
0 h	43,24	259,43	300,00	40,57	19,22	115,30	300,00	184,70	1346,77
12 h	43,24	172,95	200,00	27,05	19,22	76,87	200,00	123,13	
24 h	50,00	300,00	300,00	0,00	22,22	133,33	300,00	166,67	
36 h	50,00	200,00	200,00	0,00	22,22	88,89	200,00	111,11	
Total		932,38		67,62		414,39		585,61	

Figura 1. Resumen de cálculos realizados en Excel

Procedimiento (Preparación de los diluyentes):

9. Según las indicaciones de Tauriello:

Every couple of days I prepare fresh: 61 parts MQ 25 parts A (4x) 5 parts B (20x) 5 parts C (20x) 4 parts D (25x) 100

Fuente: (Dr Daniele Tauriello Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), comunicación personal).

10. Se debe preparar un stock de cada solución que se utilizará para la mezcla total del diluyente. En la tabla 4 se resume las concentraciones de cada solución con los volúmenes a preparar para cada una.

Concentración Final	Volumen Final	Masa soluto o Volumen de solución	Fecha Expiración	Almacenamiento
---------------------	---------------	-----------------------------------	------------------	----------------

NaCMC, 4%	50mL	2 gramos	Hasta por 6 meses	4°C
PVP, 1.7%	50mL	0,85 gramos	Hasta por 6 meses	4°C
Antifoam A, 1%	50mL	0.5mL	Hasta por 3 meses	4°C
SDS, 10%	10mL	1 gramo	6 meses o más	Temperatura Ambiente

Tabla 4. Preparación de soluciones stock

11. Solución A: NaCMC (Carboximetilcelulosa sódica) al 4%. En un tubo falcon de 15mL pesar 2 gramos del reactivo usando cucharillas estériles o forradas con papel aluminio (Evitar contaminar el producto con tomas repetidas). En la campana de flujo laminar, diluir lo pesado (agregando poco a poco), en un tubo de 50mL con 25mL de agua estéril. Agitar suavemente (con pipetas de cultivo de 1mL) hasta que disuelva y se disuelvan bien los “clumps”. Cuando se observe que el reactivo no se puede disolver en los 25mL, añadir 10mL de agua y añadir más reactivo. Repetir el procedimiento añadiendo más reactivo y más agua. Se debe agitar constantemente con la pipeta. La disolución será lenta pero al cabo de 2 horas podrá lograrse el objetivo. Dejar en reposo por 20 minutos para que los grumos se disuelvan y una vez que ocurra esto añadir el volumen faltante hasta completar 50mL.
12. Solución B: PVP (Polivinilpirrolidona) al 1.7%. En un tubo falcon de 15mL pesar 0.85 gramos del reactivo usando cucharillas estériles o forradas con papel aluminio (Evitar contaminar el producto con tomas repetidas). En la campana de flujo laminar, diluir lo pesado (agregando poco a poco), en un tubo de 50mL tomando una tercera parte del volumen final (15mL), usando agua estéril. Agitar suavemente (con pipetas de cultivo de 1mL) hasta que disuelva, luego añadir 35 mL de agua. La PVP es difícil de disolver, porque se forman grumos muy rápidos, de tal forma que se debe agitar con paciencia, hasta que se disuelve el reactivo. Dejar en reposo por varios minutos ayuda a que se disuelvan las pequeñas partículas del reactivo. Al final, antes de llevar a volumen final, se puede agitar el tubo lentamente para acelerar el proceso de disolución.
13. Solución C: Antiespumante-A al 1%. En la campana de flujo laminar y usando puntas estériles de 1mL, diluir 0.5mL de antifoam-A en 50mL de agua estéril (Usar tubos de 50mL). Agitar suavemente hasta que disuelva. Como el reactivo es viscoso se debe tener la precaución de asegurar que realmente se tomaron 500uL (pipetear los 500uL y retirar muy lentamente la punta hasta que se observe que el volumen deseado si se tomó)
14. Solución D: SDS (Dodecilsulfato sódico) al 10%. En un tubo eppendorf de 1.5mL pesar 1 gramo del reactivo usando cucharillas estériles o forradas con papel aluminio (Evitar contaminar el producto con tomas repetidas). En la campana de flujo laminar, diluir lo pesado (agregando poco a poco), en un tubo

de 15mL en 3mL de agua hasta que disuelva. Luego en pasos repetidos, añadir reactivo y agua estéril hasta completar 10mL. En la preparación de SDS se forman muchas burbujas, de tal forma que se tiene que tener la precaución de no agitar con tanta rapidez para evitar la formación de burbujas.

15. Luego de preparar cada stock, se debe calcular la cantidad de solución a usar para alcanzar una concentración final de 1% (4x) para el reactivo A; de 0.085% (20x) para el reactivo B; de 0.05% (20x) para el reactivo C; y de 0.4% (25x) para el reactivo D, para un volumen final de 2mL. En la tabla 5 se resume el procedimiento: (Mirar tabla Excel para ver los cálculos)

	Reactivo A (CMC)	Reactivo B (PVP)	Reactivo C (AntiE)	Reactivo D (SDS)	Agua estéril
Ci. del Stock	4%	1.7%	1%	10%	15,25
C. final	1%	0.085%	0.05%	0.4%	
V. final*	25mL	25mL	25mL	25mL	
V. inicial	6,25	1,25	1,25	1,00	

Tabla 5. Procedimiento de preparación de la mezcla de diluyentes del GAL. *Se debe preparar diluyente de acuerdo con lo que se usará para el experimento

16. Usando pipetas estériles, en campana de flujo laminar, mezclar todos estos componentes en un tubo de 50mL.
17. Una vez mezclado todos los componentes mantener a 4°C hasta su uso. (Usar en menos de tres días).

Procedimiento (Mezcla de Galunisertib y diluyente):

18. En un tubo falcon de 15mL pesar la cantidad requerida de GAL usando cucharillas estériles o forradas con papel aluminio. (Evitar contaminar el producto con tomas repetidas).
19. Siguiendo las tablas Excel, en un tubo de 50mL (según Tauriello), mezclar el GAL en la cantidad requerida de vehículo a usar.
20. Añadir el GAL (poco a poco). Mezclar bien, invertir, agitar, hacer vórtex. Se hará una fina suspensión pero no se disolverá totalmente, siempre habrá un precipitado.
21. Una vez preparada la mezcla se puede mantener a 4°C. Pero, media hora antes de su uso se debe dejar a temperatura ambiente.
22. Antes de cada administración, la mezcla debe ser agitada constantemente.

F. Anexo: Aprobación por parte del comité de Bioética

 Pontificia Universidad
JAVERIANA
Bogotá

FM-CIE-8099-14

**EL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA PONTIFICIA
UNIVERSIDAD JAVERIANA**

Ref. 2014/76

CERTIFICA

Que el proyecto de investigación titulado "*Papel del TGF- β en la inmunidad contra rotavirus en el modelo murino*", cuyo investigador principal es *Manuel Antonio Franco* del Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, fue evaluado y aprobado por parte del Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina, en su sesión del 22 de mayo de 2014, considerando la pertinencia de la investigación, el rigor metodológico, su calidad científica, la coherencia y la racionalidad del presupuesto propuesto y el cumplimiento de las normas Científicas, técnicas y éticas, nacionales e internacionales que rigen este tipo de investigaciones.

Sobre el posible impacto en el medio ambiente, el Comité conceptúa que por la naturaleza de la investigación, el proyecto no tiene efectos negativos sobre el medio ambiente.

Con base en lo expresado anteriormente, el Comité de Investigación y Ética conceptúa que el proyecto cumple con todos los requisitos de calidad exigidos y en consecuencia otorga su aprobación; el respectivo concepto se consigna en el acta N° 9 de la correspondiente sesión.

Para este proyecto se prevé que los resultados ameritan ser protegidos por los instrumentos de propiedad intelectual (y/o) ser explotados comercialmente. Por lo anterior, se solicitará a la Universidad adelantar los trámites respectivos según lo previsto en la política de propiedad intelectual.

Se expide esta certificación el 27 de mayo de 2014.

Solicito mencionar el número de identificación anotado en la referencia, para la correspondencia futura sobre esta investigación.

Atentamente,


MARY BERMÚDEZ GÓMEZ MD, MSc.
Presidente Comité de Investigaciones y Ética

INVESTIGACIONES Y ÉTICA
Comité de Investigación y Ética
Ingeniería
Bogotá, D.C. - Colombia

Facultad de Medicina – Comité de Investigaciones y Ética
Hospital Universitario San Ignacio, Carrera 7ª N° 40 – 62, Piso 2, Bogotá, Colombia, PBX (57-1) 3208320 Ext.2770 – 2879227,
Fax 2882284



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Bogotá

27 de Abril de 2017

FM-CIE-0095-17

**EL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA PONTIFICIA
UNIVERSIDAD JAVERIANA**

Ref. 2017/34

CERTIFICA

Que el proyecto de investigación titulado "*Papel del TGF-beta en la inmunidad contra rotavirus en un modelo murino de delección inducible del receptor II de la citosina*", cuyo investigador principal es **Manuel Antonio Franco**, del Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, fue evaluado y aprobado por parte del Comité de Investigación y Ética Institucional de la Facultad de Medicina, en su sesión del 27 de Abril de 2017, considerando la pertinencia de la investigación, el rigor metodológico, su calidad científica, la coherencia y la racionalidad del presupuesto propuesto y el cumplimiento de las normas Científicas, técnicas y éticas, nacionales e internacionales que rigen este tipo de investigaciones.

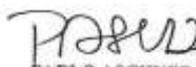
Sobre el posible impacto en el medio ambiente, el Comité conceptúa que por la naturaleza de la investigación, el proyecto no tiene efectos negativos sobre el medio ambiente.

Con base en lo expresado anteriormente, el Comité de Investigación y Ética Institucional conceptúa que el proyecto cumple con todos los requisitos de calidad exigidos y en consecuencia otorga su aprobación; el respectivo concepto se consigna en el acta N° 06 de la correspondiente sesión.

Se expide esta certificación el 27 de Abril de 2017.

Solicito mencionar el número de identificación anotado en la referencia, para la correspondencia futura sobre esta investigación.

Atentamente,


PABLO ASCHNER MONTOYA, MD, MSc
Presidente (Encargado) Comité de Investigaciones y Ética

Copia: Archivo de Comité de Investigaciones y Ética
Ingrid I.



Facultad de Medicina – Comité de Investigaciones y Ética

Hospital Universitario San Ignacio, Carrera 7° N° 40 – 62, Piso 2, Bogotá, Colombia, PBX (57-1) 3208320 Ext.2770 – 2879227,
Fax 2882284

G. Anexo: Aprobación por parte del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio-PUJ

 <p>Pontificia Universidad JAVERIANA Bogotá</p>
Documento N° C-011-14
<p>Bogotá D.C., 19 de mayo de 2014.</p> <p>Profesor Manuel Franco. Pontificia Universidad Javeriana. La Ciudad</p> <p>Respetado Profesor:</p> <p>En mi calidad de Presidente del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Pontificia Universidad Javeriana (CICUAL-PUJ) me dirijo a usted para comunicarle que el protocolo titulado: "Papel del TGF-beta en la inmunidad contra rotavirus en el modelo murino". Con el número de registro FUA 006-14, fue revisado y discutido por el Comité en su reunión ordinaria del 16 de mayo de 2014 (Acta 004-2014). El mismo fue APROBADO.</p> <p>Con esta aprobación se pueden iniciar los trabajos experimentales que involucren el uso de modelos animales asociados a este protocolo. Durante el desarrollo del estudio, el CICUAL programará un monitoreo pos-aprobación de protocolos, en el cual la coordinadora de monitoreos realizará una evaluación de las condiciones de la unidad de alojamiento y las prácticas asociadas al uso de los animales.</p> <p>Quedamos atentos a cualquier comentario o inquietud adicional. Reciba un saludo cordial,</p> <p></p> <p>CAMILO DURAN Presidente CICUAL-PUJ</p>
<small>Página 1 de 2</small>
<p>Facultad de Ciencias-CICUAL PUJ Carrera.7 No.40-62, Bioterio Central. Bogotá, Colombia. PBX (57-1) 3208320 Ext 4302</p>

 Pontificia Universidad
JAVERIANA
Bogotá

Documento N° C-097-17

Bogotá D.C., 26 de abril de 2017

Doctor
MANUEL ANTONIO FRANCO
Pontificia Universidad Javeriana
La Ciudad

Respetado Doctor:

En mi calidad de Presidente del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Pontificia Universidad Javeriana (CICUAL-PUJ) me dirijo a usted para comunicarle que las correcciones solicitadas del proyecto titulado **Papel del TGF- β en la inmunidad contra rotavirus en un modelo murino de delección inducible del receptor II de la citocina**, con el número de registro FUA 044-17, fueron revisadas. El mismo fue **AVALADO**.

Con este aval se pueden iniciar los trabajos experimentales que involucren el uso de modelos animales asociados a este protocolo. Durante el desarrollo del estudio, el CICUAL programará un monitoreo pos-aprobación de protocolos en el cual la coordinadora de monitoreos realizará una evaluación de las condiciones de la unidad de alojamiento y los procedimientos asociados al uso de los animales.

Por favor revise el instructivo adjunto que debe tenerse en cuenta para el desarrollo del proyecto con el seguimiento del CICUAL, así mismo, una vez se tenga el cronograma de actividades con animales debe ser enviado al comité.

Quedamos atentos a cualquier solicitud o aclaración adicional

Cordial saludo,



LORENZA JARAMILLO
Presidenta
CICUAL-PUJ
lorenzaj@javeriana.edu.co

Página 1 de 1

Facultad de Ciencias–CICUAL PUJ
Carrera.7 No.40-62, Unidad de Biología Comparativa. Bogotá, Colombia, PBX (57-1) 3208320 Ext 4302

H. Anexo: Aprobación de Financiación del Proyecto

Kewin Fabian Cardenas Cristancho

De: Gestión de la Investigación - Vicerrectoría de Investigación
Enviado el: jueves, 16 de noviembre de 2017 2:19 p. m.
Para: Manuel Antonio Franco Cortes
CC: Carlos Gomez Restrepo; Alberto Gomez Gutierrez; Diana Marcela Ochoa Ramos; Claudia Giselle Tovar Mera; Paola Andrea Velasco Escobar; Rosalba Alvarez Rondon; Liliana Echeverry Hernandez; Paola Carmenza Barbosa Ayala; Milena Fernanda Sierra Navarro; Kewin Fabian Cardenas Cristancho
Asunto: Financiación_PPTA 7684_Convocatoria Apoyo a proyectos interdisciplinarios de investigación

Respetado profesor Manuel Antonio Franco Cortes

Hace algunas semanas entregamos los resultados de las convocatorias internas 2017, y algunos proyectos no pudieron ser financiados por razones presupuestales. No obstante, gracias a un esfuerzo administrativo de la Universidad, contamos ahora, de manera extraordinaria para este año, con una fuente complementaria de recursos que nos permitirá financiar un grupo adicional de proyectos.

Así, su proyecto "*Papel del TGF- β en la inmunidad contra rotavirus en un modelo murino de delección inducible del receptor II de la citocina*", será financiado a través de la Convocatoria Apoyo a proyectos interdisciplinarios de investigación. Felicitaciones, confiamos en que este aporte contribuya al desarrollo de su agenda de investigación.

En los próximos días recibirá un correo de Paola Barbosa Ayala con información sobre el presupuesto de su proyecto.

Cordial saludo



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Bogotá

Gonzalo Hernández
Director de Investigación
Vicerrectoría de Investigación
Pontificia Universidad Javeriana
Tel. 320 83 20 ext. 2067
<http://www.javeriana.edu.co/blogs/gonzalohernandez/>

 COLCIENCIAS	 TODOS POR UN NUEVO PAÍS PAZ EQUIDAD EDUCACIÓN
 20153100060231	
PCB	
Bogotá, 20-05-2015	
Doctor MANUEL ANTONIO FRANCO Investigador Principal PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA Carrera 7 No. 40-62 Bogotá, Cundinamarca	
Asunto: Carta de inicio del proyecto 120365842530, contrato 002-2015.	
Apreciado Investigador,	
El Programa Nacional en Ciencias Básicas, en línea con las políticas de Colciencias, le remitió vía correo electrónico copia del contrato No. 002-2015, suscrito entre COLCIENCIAS y la PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA, cuyo objeto es el financiamiento, en la modalidad de recuperación contingente, del proyecto "Papel del TGF-beta en la inmunidad contra rotavirus en el modelo murino" código 120365842530.	
Con respecto a lo anterior, quisiera resaltar algunos aspectos de importancia para la ejecución del proyecto:	
<ol style="list-style-type: none">1. Fecha de desembolso: 13 de mayo de 2015.2. Valor del desembolso: \$ 135.918.908.00 m/cte.3. Duración del proyecto: 36 meses.4. Fecha de inicio de la ejecución del proyecto: 13 de mayo de 2015.5. Fecha de finalización de la ejecución del proyecto: 13 de mayo de 2018.6. Fecha de entrega de informes de avance técnico y financiero: 13 de septiembre de 2016.7. Fecha de entrega de informes finales técnico y financiero: 13 de junio de 2018.8. Es necesario solicitar formalmente a Colciencias la autorización de la vinculación del personal que vaya a ser contratado, así como los estudiantes que participarán en el proyecto. Adicionalmente, con la solicitud debe adjuntar las respectivas hojas de vida y aclarar cuáles serían las funciones de dicho personal en el marco del proyecto.9. Igualmente, debe solicitar la autorización previa del supervisor del contrato, para el traslado de recursos de un rubro a otro, siempre que el cambio de rubro exceda el veinte por ciento (20%) del rubro de destino, en el presupuesto inicial. Si no es así, usted puede con total autonomía, realizar los cambios de rubros y reflejarlo de manera detallada en los informes financieros; anexando los respectivos soportes.	
Carrera 7 B bis N° 132-28 Teléfono: (57-1) 625 8480 Fax: (57-1) 625 1788 Bogotá D.C. - Colombia www.colciencias.gov.co	



10. En la eventualidad de ser necesaria una extensión de tiempo en el periodo de ejecución técnica del proyecto, le sugerimos considerar la posibilidad de solicitar una prórroga del contrato, de acuerdo a la Cláusula Vigésimo Quinta, con por lo menos tres (3) meses de anticipación al vencimiento de dicho periodo. Esta deberá estar respaldada por una justificación claramente argumentada de las razones por las cuales usted solicita dicho trámite, así como contar con el aval de la institución.

Le agradecemos tener en cuenta los puntos anteriores, con el fin de evitar posibles inconvenientes que pudieran surgir como resultado de incumplimiento de las Cláusulas contractuales en cuestión.

Notas:

-Los formatos para la presentación de informes técnico y financiero (avance y final), se encuentran disponibles en el link <http://www.colciencias.gov.co/calidad>, con la siguiente nomenclatura:

- Informe de ejecución financiera consolidado M301PR03F02.
- Informe detallado de gastos por rubro M301PR03F03.
- Informe técnico de avance o final de programas y proyectos de CTel MM301PR03F08.

-Por otra parte, se recuerda dar cumplimiento al aporte de contrapartida establecido en los términos de referencia de la convocatoria 658 y en la Cláusula Sexta del contrato. Este será supervisado en cada uno de los informes financieros enviados a Colciencias.

Deseándole éxitos en el desarrollo y ejecución de su proyecto.

Cordialmente,

MIGUEL TOBAR
Asesor
Programa Nacional en Ciencias Básicas

CAROLINA VIZCAINO
Asesora
Programa Nacional en Ciencias Básicas

Elaborado por CVIZCAINO

Carrera 7 B bis N° 132-28
Teléfono: (57-1) 625 8480
Fax: (57-1) 625 1788
Bogotá D.C. - Colombia
www.colciencias.gov.co

I. Anexo: Artículo aceptado en Journal of Virology

Accepted Manuscript Posted Online

JVI Accepted Manuscript Posted Online 10 July 2019
J. Virol. doi:10.1128/JVI.00882-19
Copyright © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

1 LAP⁺ cells modulate protection induced by oral vaccination with Rhesus Rotavirus in a
2 neonatal mouse model
3

4 Laura Maria Rey,^a José Ángel Gil,^{a,d} José Mateus,^b Luz-Stella Rodríguez,^a Martín Alonso
5 Rondón,^c Juana Ángel,^a and Manuel Antonio Franco^{a,#}
6

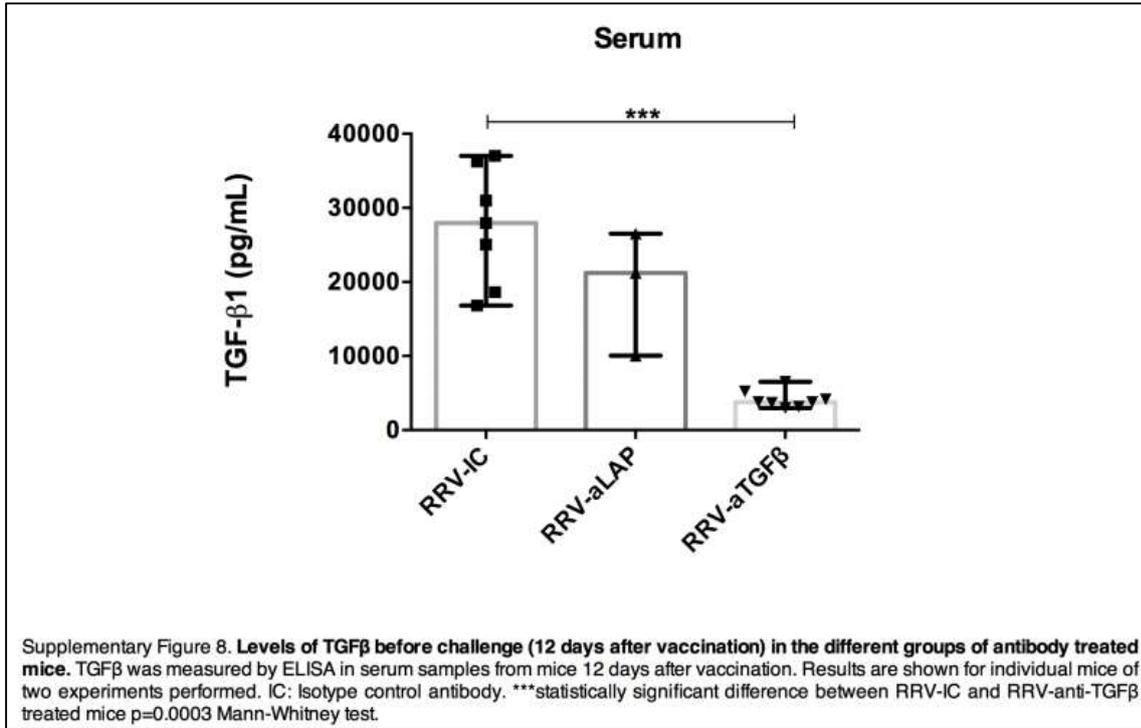
7 ^aInstituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana,
8 Bogotá, Colombia.
9 ^bDepartment of Microbiology, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
10 ^cDepartment of Clinical Epidemiology and Biostatistics, Pontificia Universidad
11 Javeriana, Bogotá, Colombia.
12 ^dDepartment of Pharmacy, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
13

14 Running Head: LAP⁺ cells modulate immunity to RV in neonatal mice
15

16 #Address correspondence to Manuel Franco, mafranco@javeriana.edu.co
17 Word count: abstract 174 / text 5370
18
19
20
21

JVI
Journal of Virology

Downloaded from <http://jvi.asm.org/> on July 12, 2019 by guest



Bibliografía

- Angel, J., Franco, M. A., & Greenberg, H. B. (2007). Rotavirus vaccines: Recent developments and future considerations. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(7), 529–539. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1692>
- Ashland. (2013). PVP K-90 polymer. Retrieved September 27, 2018, from https://www.brenntag.com/media/documents/bsi/product_data_sheets/material_science/ashland_polymers/pvp_k-90_polymer_pds.pdf
- Baratelli, F., Lin, Y., Zhu, L., Yang, S.-C., Heuze-Vourc'h, N., Zeng, G., Dubinett, S. M. (2005). Prostaglandin E2 Induces FOXP3 Gene Expression and T Regulatory Cell Function in Human CD4+ T Cells. *The Journal of Immunology*, *175*(3), 1483–1490. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1483>
- Barreto, A., Rodríguez, L.-S., Rojas, O. L., Wolf, M., Greenberg, H. B., Franco, M. A., & Angel, J. (2010). Membrane Vesicles Released by Intestinal Epithelial Cells Infected with Rotavirus Inhibit T-Cell Function. *Viral Immunology*, *23*(6), 595–608. <https://doi.org/10.1089/vim.2009.0113>
- Blutt, S. E., Crawford, S. E., Warfield, K. L., Lewis, D. E., Estes, M. K., & Conner, M. E. (2004). The VP7 Outer Capsid Protein of Rotavirus Induces Polyclonal B-Cell Activation. *Journal of Virology*, *78*(13), 6974–6981. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.13.6974-6981.2004>
- Boster Biological Technology. (2019). How to become an ELISA expert in 4 days. Retrieved June 27, 2019, from <https://www.bosterbio.com/elisa-troubleshooting-guide-download-page>
- Brandes, A. A., Carpentier, A. F., Kesari, S., Sepulveda-Sanchez, J. M., Wheeler, H. R., Chinot, O., Wick, W. (2016). A Phase II randomized study of galunisertib monotherapy or galunisertib plus lomustine compared with lomustine monotherapy in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncology*, *18*(8), 1146–1156. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now009>
- Burns, J. W., Krishnaney, A. A., Vo, P. T., Rouse, R. V, Anderson, L. J., & Greenberg, H.

- B. (1995). Analyses of homologous rotavirus infection in the mouse model. *Virology*, 207(1), 143–153. [https://doi.org/S0042-6822\(85\)71060-4](https://doi.org/S0042-6822(85)71060-4) [pii] 10.1006/viro.1995.1060
- Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D. V., Iglesias, M., Cespedes, M. V., Batlle, E. (2012). Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell*, 22(5), 571–584. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.08.013>
- Cerutti, A., & Rescigno, M. (2008). The Biology of Intestinal Immunoglobulin A Responses. *Immunity*, 28(6), 740–750. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.001>
- Chakraborty, S., Bhattacharyya, R., & Banerjee, D. (2017). *Infections: A Possible Risk Factor for Type 2 Diabetes. Advances in Clinical Chemistry* (1st ed., Vol. 80). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.11.004>
- Chanda, S., Nandi, S., & Chawla-Sarkar, M. (2016). Rotavirus-induced miR-142-5p elicits proviral milieu by targeting non-canonical transforming growth factor beta signalling and apoptosis in cells. *Cellular Microbiology*, 18(5), 733–747. <https://doi.org/10.1111/cmi.12544>
- Chemical Book. (2017). Polyvinylpyrrolidone. Retrieved September 27, 2018, from https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4209342.htm
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., Wahl, S. M. (2003). Conversion of Peripheral CD4⁺ CD25⁻ Naive T Cells to CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor *Foxp3*. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1875–1886. <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>
- CIR Expert Panel. (1986). Final Report on the Safety Assessment of Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Methylcellulose, and Cellulose Gum. *International Journal of Toxicology*, 5(3), 1–59. <https://doi.org/10.3109/10915818609141925>
- Colak, S., & ten Dijke, P. (2017). Targeting TGF- β Signaling in Cancer. *Trends in Cancer*, 3(1), 56–71. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.11.008>
- Cong, L., Xia, Z. K., & Yang, R. Y. (2014). Targeting the TGF- β receptor with kinase inhibitors for scleroderma therapy. *Archiv Der Pharmazie*, 347(9), 609–615. <https://doi.org/10.1002/ardp.201400116>
- Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., Estes, M. K. (2017). Rotavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 3:17083.

- <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>
- Cutler, M. G., Collings, A. J., Kiss, I. S., & Sharratt, M. (1974). A lifespan study of a polydimethylsiloxane in the mouse. *Food and Cosmetics Toxicology*, *12*(4), 443–450. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(74\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0015-6264(74)90057-1)
- Dalby-Payne, J., & Elliott, E. (2002). Acute gastroenteritis in children. *Australian Family Physician*, *62*(7), 35–40. Retrieved from <http://www.pntonline.co.za/index.php/PNT/article/viewArticle/453>
- De Miguel Durán, F., & Perdomo Giraldi, M. (2011). Gastroenteritis aguda. Deshidratación. *Pediatría Integral*, *15*(1), 54–60.
- De Santis, A., Fabris, L., Fontani, F., Tacconi, F., & Zorzetto, C. (1970). Carboxymethylcellulose sodium. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, *109*(9), 499–501. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31822adba3>
- Denney, L., Branchett, W., Gregory, L. G., Oliver, R. A., & Lloyd, C. M. (2018). Epithelial-derived TGF- β 1 acts as a pro-viral factor in the lung during influenza A infection. *Mucosal Immunology*, *11*(2), 523–535. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.77>
- Feng, N., Burns, J. W., Bracy, L., & Greenberg, H. B. (1994). Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous or a heterologous rotavirus. *Journal of Virology*, *68*(12), 7766–7773. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=237238&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Feng, N., Yasukawa, L. L., Sen, A., & Greenberg, H. B. (2013). Permissive Replication of Homologous Murine Rotavirus in the Mouse Intestine Is Primarily Regulated by VP4 and NSP1. *Journal of Virology*, *87*(15), 8307–8316. <https://doi.org/10.1128/JVI.00619-13>
- Franco-Cortés, M. A. (2016). Papel del TGF- β en la inmunidad contra los rotavirus. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, *40*(154), 18. <https://doi.org/10.18257/raccefy.300>
- García-Dorado, D., Cuartas, I., Prudkin, L., Baselga, J., Lahn, M. M., Rodón, L., Yingling, J. M. (2010). TGF- β Receptor Inhibitors Target the CD44^{high}/Id1^{high} Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell*, *18*(6), 655–668. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.023>
- Giannelli, G., Villa, E., & Lahn, M. (2014). Transforming growth factor- β as a therapeutic

- target in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, 74(7), 1890–1894. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0243>
- Gomes-Santos, A. C., Oliveira, R. P. de, Moreira, T. G., Azevedo, V. A. C., Almeida, L. A. de, Rezende, R. M., Faria, A. M. C. (2017). Hsp65-Producing *Lactococcus lactis* Prevents Inflammatory Intestinal Disease in Mice by IL-10- and TLR2-Dependent Pathways. *Frontiers in Immunology*, 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00030>
- Gorelik, L., Fields, P. E., & Flavell, R. A. (2000). Cutting Edge: TGF- Inhibits Th Type 2 Development Through Inhibition of GATA-3 Expression. *The Journal of Immunology*, 165(9), 4773–4777. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.9.4773>
- Greenberg, H. B., & Estes, M. K. (2009). Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. *Gastroenterology*, 136(6), 1939–1951. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.076>
- Herbertz, S., Sawyer, J. S., Stauber, A. J., Gueorguieva, I., Driscoll, K. E., Estrem, S. T., ... Lahn, M. M. (2015). Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway. *Drug Des Devel Ther*, 9, 4479–4499. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S86621>
- Holmgaard, R. B., Schaer, D. A., Li, Y., Castaneda, S. P., Murphy, M. Y., Xu, X., Driscoll, K. E. (2018). Targeting the TGF β pathway with galunisertib, a TGF β RI small molecule inhibitor, promotes anti-tumor immunity leading to durable, complete responses, as monotherapy and in combination with checkpoint blockade. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0356-4>
- Hu, L., Crawford, S. E., Hyser, J. M., Estes, M. K., & Prasad, B. V. V. (2012). Rotavirus non-structural proteins: Structure and function. *Current Opinion in Virology*, 2(4), 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.06.003>
- Iliev, I. D., Mileti, E., Matteoli, G., Chieppa, M., & Rescigno, M. (2009). Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunology*, 2(4), 340–350. <https://doi.org/10.1038/mi.2009.13>
- Jabeen, R., & Kaplan, M. H. (2012). The symphony of the ninth: The development and function of Th9 cells. *Current Opinion in Immunology*, 24(3), 303–307. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.02.001>
- Jaimés, M. C., Rojas, O. L., Gonzalez, A. M., Cajiao, I., Charpilienne, A., Pothier, P., ... Angel, J. (2002). Frequencies of Virus-Specific CD4+ and CD8+ T Lymphocytes

- Secreting Gamma Interferon after Acute Natural Rotavirus Infection in Children and Adults. *Journal of Virology*, 76(10), 4741–4749. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.10.4741-4749.2002>
- Kawahara, T., Makizaki, Y., Oikawa, Y., Tanaka, Y., Maeda, A., Shimakawa, M., Taniguchi, K. (2017). Oral administration of *Bifidobacterium bifidum* G9-1 alleviates rotavirus gastroenteritis through regulation of intestinal homeostasis by inducing mucosal protective factors. *PLoS ONE*, 12(3), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173979>
- Kelly, A., Houston, S. A., Sherwood, E., Casulli, J., & Travis, M. A. (2017). Regulation of Innate and Adaptive Immunity by TGF β . *Advances in Immunology*, 134, 137–233. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2017.01.001>
- Kelly M Credill, A. J. S. (2014). Nonclinical Safety Evaluation of a Transforming Growth Factor β Receptor I Kinase Inhibitor in Fischer 344 Rats and Beagle Dogs. *Journal of Clinical Toxicology*, 04(03). <https://doi.org/10.4172/2161-0495.196>
- Konkel, J. E., Jin, W., Abbatiello, B., Grainger, J. R., & Chen, W. (2014). Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(4), E465–E473. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320319111>
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 485–517. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>
- Laouar, Y., Sutterwala, F. S., Gorelik, L., & Flavell, R. A. (2005). Transforming growth factor- β controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon- γ . *Nature Immunology*, 6(6), 600–607. <https://doi.org/10.1038/ni1197>
- Laping, N. J. (2002). Inhibition of Transforming Growth Factor (TGF)-beta 1-Induced Extracellular Matrix with a Novel Inhibitor of the TGF-beta Type I Receptor Kinase Activity: SB-431542. *Molecular Pharmacology*, 62(1), 58–64. <https://doi.org/10.1124/mol.62.1.58>
- Lazarevic, V., Glimcher, L. H., & Lord, G. M. (2013). T-bet: A bridge between innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(11), 777–789. <https://doi.org/10.1038/nri3536>
- Lin, G. J., Sytwu, H. K., Yu, J. C., Chen, Y. W., Kuo, Y. L., Yu, C. C., Huang, S. H. (2015). Dimethyl sulfoxide inhibits spontaneous diabetes and autoimmune recurrence in non-

- obese diabetic mice by inducing differentiation of regulatory T cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 282(2), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.11.012>
- Liu, F., Li, G., Wen, K., Wu, S., Zhang, Y., Bui, T., Yuan, L. (2013). Lactobacillus rhamnosus gg on rotavirus-induced injury of ileal epithelium in gnotobiotic pigs. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 57(6), 750–758. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3182a356e1>
- Liu, X., Yu, M., Chen, Y., & Zhang, J. (2016). Galunisertib (LY2157299), a transforming growth factor-beta receptor I kinase inhibitor, attenuates acute pancreatitis in rats. *Braz J Med Biol Res*, 49(9), e5388. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165388>
- Ludert, J. E., Pujol, F. H., & Arbiza, J. (2017). *Human virology in Latin America: From biology to control* (Springer I). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54567-7>
- Mackow, E. R., Shaw, R. D., Matsui, S. M., Vo, P. T., Dang, M. N., & Greenberg, H. B. (1988). The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(3), 645–649. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.3.645>
- Maizels, R. M., Smits, H. H., & McSorley, H. J. (2018). Modulation of Host Immunity by Helminths: The Expanding Repertoire of Parasite Effector Molecules. *Immunity*, 49(5), 801–818. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.016>
- Mazzocchi, G., Paziienza, V., Panza, A., Valvano, M. R., Benegiamo, G., Vinciguerra, M., Piepoli, A. (2012). ARNTL2 and SERPINE1: Potential biomarkers for tumor aggressiveness in colorectal cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138(3), 501–511. <https://doi.org/10.1007/s00432-011-1126-6>
- McNeal, M. M., & Bernstein, D. I. (2014). Rotaviruses. In *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control* (pp. 713–732). https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7448-8_30
- Medicines Agency, E. (2015). Background review for sodium laurilsulfate used as an excipient. *Committee for Human Medicinal Products (CHMP)*, 44(July).
- Meliopoulos, V. A., Van de Velde, L. A., Van de Velde, N. C., Karlsson, E. A., Neale, G., Vogel, P., ... Schultz-Cherry, S. (2016). An Epithelial Integrin Regulates the Amplitude of Protective Lung Interferon Responses against Multiple Respiratory Pathogens. *PLoS Pathogens*, 12(8), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005804>

- Melisi, D., Garcia-Carbonero, R., Macarulla, T., Pezet, D., Deplanque, G., Fuchs, M., ... Tabernero, J. (2018). Galunisertib plus gemcitabine vs. gemcitabine for first-line treatment of patients with unresectable pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 119(10), 1208–1214. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0246-z>
- Merck. (2003). Sodium dodecyl sulfate Product Information. Retrieved September 27, 2018, from <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l3771?lang=en®ion=CO>
- Merck. (2018a). Antifoam A concentrate. Retrieved September 27, 2018, from <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a6582?lang=en®ion=CO>
- Merck. (2018b). Carboxymethylcellulose sodium salt. Retrieved September 27, 2018, from <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c5678?lang=en®ion=CO>
- Mesa, M. C., Gutiérrez, L., Duarte-Rey, C., Angel, J., & Franco, M. A. (2010). A TGF- β mediated regulatory mechanism modulates the T cell immune response to rotavirus in adults but not in children. *Virology*, 399(1), 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.12.016>
- Midthun, K., Greenberg, H. B., Hoshino, Y., Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., & Chanock, R. M. (1985). Reassortant rotaviruses as potential live rotavirus vaccine candidates. *Journal of Virology*, 53(3), 949–954. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2983101>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC254731>
- Min, J., Jin, C., Piao, H.-R., Zhao, L.-M., Guo, Z., Zhu, W.-J., Li, X.-Y. (2018). Synthesis and Evaluation of 3-Substituted-4-(quinoxalin-6-yl) Pyrazoles as TGF- β Type I Receptor Kinase Inhibitors. *Molecules*, 23(12), 3369. <https://doi.org/10.3390/molecules23123369>
- Mondal, M. I. H., & Yeasmin, M. S. (2016). Toxicity study of food-grade carboxymethyl cellulose synthesized from maize husk in Swiss albino mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 965–971. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.012>
- Moore, A. F. (1983). Final Report on the Safety Assessment of Sodium Lauryl Sulfate and Ammonium Lauryl Sulfate. *International Journal of Toxicology*, 2(7), 127–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.3109/10915818309142005>
- Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J. D., Dalton, S. L., Wu, J., ... Sheppard, D. (1999). The integrin $\alpha\beta 6$ binds and activates latent TGF $\beta 1$: A

- mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*, 96(3), 319–328. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80545-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80545-0)
- Murphy-Ullrich, J. E., & Suto, M. J. (2018). *Thrombospondin-1 regulation of latent TGF- β activation: A therapeutic target for fibrotic disease*. *Matrix Biology* (Vol. 68–69). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.009>
- Murphy, K. (2012). *Janeway's Immunobiology*. (Garland Science, Ed.) (8th Editio). London and New York.
- Nair, B. (1998). Final Report On the Safety Assessment of Polyvinylpyrrolidone (PVP). *International Journal of Toxicology*, 17(5_suppl2), 95–130. <https://doi.org/10.1177/1091581817716649>
- Nakanishi, M., & Rosenberg, D. W. (2013). Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Seminars in Immunopathology*, 35(2), 123–137. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0342-8>
- National Toxicology Program. (1992). Toxicology and carcinogenesis studies of polysorbate 80 in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 415. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Owen, J., Punt, J., Stranford, S., & Jones, P. (2015). *Kuby Immunology* (Seventh Ed). New York: W.H. Freeman and Company. <https://doi.org/10.15713/ins.mmj.3>
- Parra Avila, M. H., Ángel Uribe, J., & Franco, M. A. (2014). *Caracterización de los linfocitos T CD4 específicos de rotavirus*. *Instituto de Genética Humana*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10554/15425>
- Parra, M., Herrera, D., Jácome, M. F., Mesa, M. C., Rodríguez, L. S., Guzmán, C., ... Franco, M. A. (2014). Circulating rotavirus-specific T cells have a poor functional profile. *Virology*, 468–470, 340–350. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.08.020>
- Pathophysiology Vivo. (2014). Villi , Crypts and the Life Cycle of Small Intestinal Enterocytes. Retrieved June 26, 2019, from <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/smallgut/lifecycle.html>
- Paul, W. E. (2008). *Fundamental Immunology*. (Wolters Kluwer, Ed.) (Sixth Edit). Philadelphia.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Rey, L. M. (2018). *Papel del TGFBeta en la inmunidad contra el rotavirus en el modelo*

- múrido neonatal*. Tesis de Maestría, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Rey, L. M., Gil, J. A., Mateus, J., Rodríguez, L.-S., Rondón, M., Ángel, J., & Franco, M. A. (2019). LAP + cells modulate protection induced by oral vaccination with Rhesus Rotavirus in a neonatal mouse model. *Journal of Virology, JVI Accept.* <https://doi.org/10.1128/JVI.00882-19>
- Rezende, R. M., & Weiner, H. L. (2018). Cellular Components and Mechanisms of Oral Tolerance Induction. *Critical Reviews in Immunology, 38*(3), 207–231. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.2018026181>
- Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G. M., Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nature Immunology, 6*(5), 507–514. <https://doi.org/10.1038/ni1192>
- Rodon, J., Carducci, M. A., Sepulveda-Sánchez, J. M., Azaro, A., Calvo, E., Seoane, J., Baselga, J. (2015). First-in-human dose study of the novel transforming growth factor- β receptor I kinase inhibitor LY2157299 monohydrate in patients with advanced cancer and glioma. *Clinical Cancer Research, 21*(3), 553–560. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1380>
- Rodríguez, L.-S., Barreto, A., Franco, M. A., & Angel, J. (2009). Immunomodulators Released During Rotavirus Infection of Polarized Caco-2 Cells. *Viral Immunology, 22*(3), 163–172. <https://doi.org/10.1089/vim.2008.0110>
- Rodríguez, L. S., Narváez, C. F., Rojas, O. L., Franco, M. A., & Ángel, J. (2012). Human myeloid dendritic cells treated with supernatants of rotavirus infected Caco-2 cells induce a poor Th1 response. *Cellular Immunology, 272*(2), 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.10.017>
- Ruiz, M. C., Leon, T., Díaz, Y., & Michelangeli, F. (2009). Molecular Biology of Rotavirus Entry and Replication, 1476–1497. <https://doi.org/10.1100/tsw.2009.158>
- Schmittgen, T. D. (2006). *Quantitative gene expression by real-time PCR: a complete protocol*. (Taylor & Francis Group, Ed.), *Real-time PCR*. <https://doi.org/10.4016/17251.01>
- Segawa, S., Goto, D., Yoshiga, Y., Sugihara, M., Hayashi, T., Chino, Y., Sumida, T. (2010). Inhibition of transforming growth factor- β signalling attenuates interleukin (IL)-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease in mice. *Clinical and Experimental Immunology, 160*(3), 394–402. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04094.x>

- Srinivasan, L., Harris, M. C., & Kilpatrick, L. E. (2016). *Cytokines and Inflammatory Response in the Fetus and Neonate. Fetal and Neonatal Physiology* (Fifth Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-35214-7.00128-1>
- Swidsinski, A., Ung, V., Sydora, B. C., Loening-Baucke, V., Doerffel, Y., Verstraelen, H., & Fedorak, R. N. (2009). Bacterial overgrowth and inflammation of small intestine after carboxymethylcellulose ingestion in genetically susceptible mice. *Inflammatory Bowel Diseases*, *15*(3), 359–364. <https://doi.org/10.1002/ibd.20763>
- Tauriello, D. V. F., Palomo-Ponce, S., Stork, D., Berenguer-Llargo, A., Badia-Ramentol, J., Iglesias, M., Batlle, E. (2018). TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature*, *554*(7693), 538–543. <https://doi.org/10.1038/nature25492>
- Travis, M. A., & Sheppard, D. (2014). TGF- β Activation and Function in Immunity. *Annual Review of Immunology*, *32*(1), 51–82. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120257>
- Tronccone, E., Marafini, I., Stolfi, C., & Monteleone, G. (2018). Transforming growth factor- β 1/Smad7 in intestinal immunity, inflammation, and cancer. *Frontiers in Immunology*, *9*(JUN), 4–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01407>
- Uhnoo, I., Riepenhoff-Talty, M., Dharakul, T., Chegass, P., Fisher, J. E., Greenberg, H. B., & Ogra, P. L. (1990). Extramucosal spread and development of hepatitis in immunodeficient and normal mice infected with rhesus rotavirus. *Journal of Virology*, *64*(1), 361–368. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2152822> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC249110>
- Vancott, J. L., Prada, A. E., Mcneal, M. M., Stone, S. C., Basu, M., Huffer, B., Ward, R. L. (2006). Mice Develop Effective but Delayed Protective Immune Responses When Immunized as Neonates either Intranasally with Nonliving VP6 / LT (R192G) or Orally with Live Rhesus Rotavirus Vaccine Candidates, *80*(10), 4949–4961. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.4949>
- Villalba, M., Evans, S. R., Vidal-Vanaclocha, F., & Calvo, A. (2017). Role of TGF- β in metastatic colon cancer: it is finally time for targeted therapy. *Cell and Tissue Research*, *370*(1), 29–39. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2633-9>
- Wang, W., Donnelly, B., Bondoc, A., Mohanty, S. K., McNeal, M., Ward, R., Tiao, G. (2011).

- The Rhesus Rotavirus Gene Encoding VP4 Is a Major Determinant in the Pathogenesis of Biliary Atresia in Newborn Mice. *Journal of Virology*, 85(17), 9069–9077. <https://doi.org/10.1128/jvi.02436-10>
- Wilén, C. B., Lee, S., Hsieh, L. L., Orchard, R. C., Desai, C., Hykes, B. L., Virgin, H. W. (2018). Tropism for tuft cells determines immune promotion of norovirus pathogenesis. *Science*, 360(6385), 204–208. <https://doi.org/10.1126/science.aar3799>
- World Health Organization. (2016). Immunization, Vaccines and Biologicals, 241, 1–2.
- Worthington, J. J., Kelly, A., Smedley, C., Bauché, D., Campbell, S., Marie, J. C., & Travis, M. A. (2015). Integrin $\alpha\beta 8$ -Mediated TGF- β Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation. *Immunity*, 42(5), 903–915. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.012>
- Yingling, J. M., McMillen, W. T., Yan, L., Huang, H., Sawyer, J. S., Graff, J., Driscoll, K. E. (2018). Preclinical assessment of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a first-in-class transforming growth factor-beta receptor type I inhibitor. *Oncotarget*, 9(6), 6659–6677. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23795>
- Zhao, C., Isenberg, J. S., & Popel, A. S. (2018). Human expression patterns: qualitative and quantitative analysis of thrombospondin-1 under physiological and pathological conditions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(4), 2086–2097. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13565>
- Zhu, J., Motejlek, K., Wang, D., Zang, K., Schmidt, A., & Reichardt, L. F. (2002). Beta8 Integrins Are Required for Vascular Morphogenesis in Mouse Embryos. *Development (Cambridge, England)*, 129(12), 2891–2903. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12050137><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2710098>