

Tesis Doctoral

Prevención y tratamiento de Rotavirus A mediante nanoanticuerpos VHH anti-VP6

Maffey, Lucía

2016-12-16

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Maffey, Lucía. (2016-12-16). Prevención y tratamiento de Rotavirus A mediante nanoanticuerpos VHH anti-VP6. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Maffey, Lucía. "Prevención y tratamiento de Rotavirus A mediante nanoanticuerpos VHH anti-VP6". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-12-16.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Prevención y tratamiento de Rotavirus A mediante nanoanticuerpos VHH anti-VP6

Tesis presentada para optar por el título de Doctor
de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Lucía Maffey

Directora de Tesis: Dra. Viviana Parreño

Directora asistente: Dra. Celina G. Vega

Consejera de estudios: Dra. Laura Alché

Lugar de trabajo: Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar

Buenos Aires, 2016

Prevención y tratamiento de Rotavirus A mediante nanoanticuerpos VHH anti-VP6

Resumen

La diarrea asociada a Rotavirus A (RVA) representa una de las principales causas de mortalidad infantil a nivel mundial. Si bien la vacunación masiva contra RVA ha logrado disminuir significativamente las muertes causadas por este patógeno, la disponibilidad y la eficacia de las vacunas en zonas de bajos recursos es limitada. Por otra parte, el manejo clínico de la infección por RVA se basa en la administración de Sales de Rehidratación Oral (SRO), mientras que las opciones terapéuticas específicas resultan limitadas. El principal objetivo de este trabajo fue estudiar y optimizar la utilización de dos fragmentos correspondientes a la porción variable de anticuerpos de cadena pesada derivados de llama (VHH) dirigidos contra la proteína VP6 – 2KD1 y 3B2– para la prevención y el tratamiento de la diarrea asociada a RVA y comparar su eficacia respecto de otras opciones terapéuticas disponibles.

En primer lugar, se analizó la eficacia de ambos clones de VHH anti-VP6 para la prevención y el tratamiento de la diarrea inducida por RVA en un modelo de ratón (BALB/c) lactante inoculado con una cepa virulenta de RVA murino (EcW, G16P[16]I7). En el tratamiento profiláctico, los VHH fueron administrados oralmente dos horas antes de la inoculación viral mientras que en el tratamiento terapéutico, los VHH fueron administrados oralmente luego de la inoculación viral, tanto en forma previa a la aparición de los síntomas (pre-sintomático) como luego de la ocurrencia de diarrea (post-sintomático). En todos los casos, ratones lactantes de cuatro días de vida fueron inoculados con 1778 DD₅₀ (Dosis Diarrea 50) de RVA murino a los 0 Días Post Inoculación (DPI) y examinados diariamente para determinar la ocurrencia de diarrea y recolectar muestras de heces. Los ratones tratados y el control no tratado fueron sacrificados en forma secuencial entre los 0 y los 6 DPI para el tratamiento profiláctico y los 0 a 7 DPI en el caso de los tratamientos terapéuticos pre y post-sintomáticos. Luego de la eutanasia, se colectaron muestras de intestinos y de suero. **1. Ensayos profilácticos.** Se evaluó la eficacia de dos dosis de VHH, utilizando cuatro camadas de ratones lactantes para cada tratamiento diario: 160 µg de 2KD1+3B2 (N = 31) y 200 µg de 2KD1+3B2 (N = 30). En ambos casos, el tratamiento comenzó a los -1 DPI y continuó hasta los 6 DPI. En el DPI 0, los VHH fueron administrados dos horas antes de la inoculación viral. Los controles incluidos fueron ratones inoculados no tratados (control no tratado) y ratones no inoculados (control normal). **2. Ensayo terapéutico pre-sintomático.** Se evaluaron cuatro tratamientos orales: 160 µg de 2KD1+3B2 (80 µg de cada uno) (N = 25), 200 µg de 2KD1+3B2 (100 µg de cada uno) (N = 28), 200 µg de 3B2 (N = 24), 200 µg de 2KD1 (N = 30). Para ambos ensayos, se determinó también la presencia de anticuerpos anti-RVA en muestras de sueros e intestino a los 0, 7 y 40 DPI. Asimismo, se evaluó el surgimiento de una respuesta inmune humoral contra el tratamiento de VHH por medición de anticuerpos anti-VHH intestinales y séricos a esos tiempos y el posible surgimiento de mutantes virales de escape al tratamiento mediante PCR, secuenciación completa y análisis filogenéticos del gen codificante de VP6 en muestras de intestinos y heces positivas para RVA luego de 4-6 días de tratamiento.

Los resultados obtenidos mostraron que ambas dosis profilácticas de 2KD1+3B2 redujeron significativamente la duración y la severidad de la diarrea al igual que el título infeccioso en intestino y la excreción viral en heces. En relación al tratamiento terapéutico pre-sintomático, la administración conjunta de 2KD1 y 3B2 (200 µg) redujo significativamente la duración y severidad de la diarrea, la infección intestinal y la excreción fecal en relación al grupo no tratado. Mientras que la misma dosis de 2KD1 o 3B2 (200 µg) también redujo la duración de la diarrea por RVA con respecto al control, 2KD1 resultó más efectivo en la disminución de la infección intestinal y la excreción de RVA en heces. Si bien ambos clones presentaron amplia actividad neutralizante contra diferentes cepas de RVA *in vitro*, el clon 2KD1 requirió menores concentraciones que 3B2 para neutralizar algunas variedades, en particular la cepa de RVA murino usada en los ensayos previos. Asimismo, 2KD1 presentó valores de afinidad por las partículas de RVA tres veces mayor que 3B2 (EC₅₀). Ni el tratamiento profiláctico ni el tratamiento terapéutico pre-sintomático con VHH anti-VP6 interfirieron con la respuesta inmune humoral del hospedador frente a RVA. Tampoco se

detectaron mutantes virales de escape al tratamiento a nivel de la proteína VP6 en ningún caso. **Tratamiento terapéutico post-sintomático.** En este caso, los ratones fueron inoculados con 1778 DD₅₀ de RVA murino al cuarto día de vida como ya fuera descrito y recibieron un tratamiento diario de 200 µg de 2KD1 a partir de los 2 DPI, cuando todos los ratones presentaban diarrea, hasta los 7 DPI. El tratamiento terapéutico post-sintomático con 200 µg de 2KD1 redujo la infección intestinal por RVA y la excreción viral en heces en relación al control no tratado. Aunque hubo una tendencia a reducir la duración de los síntomas, las diferencias no fueron significativas.

Con el objetivo de evaluar la prevención de la diarrea por RVA en un modelo de administración continua de los VHH, se realizó un nuevo ensayo involucrando ratones transgénicos que expresaban los VHH anti-VP6 (2KD1+3B2) en leche materna, regulados bajo el promotor del Virus de Tumor Mamario Murino. En este caso, los ratones fueron inoculados a los cuatro días de vida con una dosis menor de RVA murino (800 DD₅₀) y se utilizaron cuatro camadas de ratones transgénicos amamantados por madres transgénicas y cuatro camadas de ratones *wild type* amamantados por madres *wild type* como control. Para descartar que la transgénesis de los ejemplares pudiera tener un efecto sobre el desarrollo de la enfermedad por RVA, se efectuó un ensayo de *cross-fostering* en el cual las progenies de cuatro madres transgénicas fueron amamantadas por madres *wild type* y viceversa. Los ratones transgénicos alimentados por madres transgénicas presentaron una menor prevalencia de diarrea a los 3, 4 y 7 DPI en relación al control. A los 8 DPI, estos ratones habían resuelto por completo el cuadro clínico. Asimismo, redujeron la infección intestinal por RVA y la excreción viral en heces en comparación con el control. Con respecto a los ensayos de *cross-fostering*, los resultados obtenidos fueron contradictorios. Si bien los ratones *wild type* amamantados por madres transgénicas redujeron la prevalencia y duración de la diarrea en relación a los ratones amamantados por madres *wild type* como se esperaba, presentaron mayores títulos infecciosos en el intestino y una mayor excreción viral fecal.

Con el propósito de comparar la eficacia de la administración oral de VHH anti-VP6 con otras opciones terapéuticas disponibles para tratar la diarrea por RVA, se realizó un último experimento en el modelo de ratón lactante infectado con 1778 DD₅₀ de RVA murino para comparar la eficacia de los nanoanticuerpos con dos drogas sintéticas (nitazoxanida, crema de bismuto) y dos hierbas aromáticas usadas tradicionalmente para el tratamiento de la diarrea (*Aloysia citrodora*, *Piper aduncum*): 2KD1+3B2 (50 mg/kg) + SRO, 2KD1(50 mg/kg) + SRO, nitazoxanida (15 mg/kg), crema de Bismuto (750 mg/kg), *A. citrodora* (infusión, 2 g/kg); *P. aduncum* (infusión, 2 g/kg). En este caso, los VHH fueron disueltos en SRO dado que la adición de este excipiente aumentaba significativamente la resistencia proteolítica frente a enzimas gástricas. A excepción de los ratones tratados con nitazoxanida, los restantes tratamientos redujeron significativamente la duración y la severidad de la diarrea por RVA en relación al control no tratado. En relación a los títulos infecciosos a nivel intestinal, los ratones tratados con VHH anti-VP6, crema de Bismuto y nitazoxanida disminuyeron la severidad de la infección mientras que aquellos tratados con *A. citrodora* y *P. aduncum* no mostraron mejoras. La excreción viral en heces sólo se redujo en los ratones tratados con VHH y nitazoxanida pero no se apreciaron diferencias significativas en el resto de los tratamientos.

El presente trabajo de tesis muestra que la administración oral de VHH anti-VP6 constituye, no sólo un tratamiento profiláctico efectivo frente a la diarrea asociada a RVA, sino también una herramienta terapéutica eficaz y segura contra la infección por este virus, incluso luego de la aparición de los primeros síntomas. En este sentido, la terapia oral con VHH anti-VP6 representaría un mejoramiento considerable en relación a otras opciones terapéuticas disponibles actualmente. Asimismo, los VHH anti-VP6 podrían ser empleados como una estrategia complementaria a la vacunación, especialmente en poblaciones que han mostrado menor eficacia de inmunización. En términos generales, el uso de anticuerpos VHH dirigidos contra VP6 presenta un enorme potencial para su implementación en pacientes inmunocomprometidos y en países de bajos recursos, donde la mortalidad por RVA continúa siendo elevada y las actuales vacunas muestran menor eficacia.

Palabras claves: Rotavirus A, diarrea, VHH, nanoanticuerpos recombinantes, prevención, tratamiento terapéutico, ratones BALB/c, optimización, mutantes virales de escape, inmunogenicidad.

Prevention and treatment of Rotavirus A using anti-VP6 VHH

Abstract

Species A Rotaviruses (RVA) remain a worldwide leading cause of child mortality. Although extensive vaccination has achieved a significant reduction in RVA-associated deaths, vaccine efficacy in some impoverished areas remains low. On the other hand, mainstay clinical management of RVA-associated diarrhea consists of Oral Rehydration Solution (ORS) administration whereas specific therapeutic options are limited. The main goal of this study was to assess and optimize the use of two VP6-specific llama-derived heavy chain antibody fragments (VHH) -2KD1 and 3B2- in the prevention and treatment of RVA-associated diarrhea and to compare the obtained results with other available therapeutic options against the disease.

We first assessed the efficacy of two VP6-specific llama-derived heavy chain antibody fragments (VHH) -2KD1 and 3B2- as an oral prophylactic and therapeutic treatment against RVA-induced diarrhea in a neonatal BALB/c mouse model inoculated with virulent murine RVA (ECw strain, G16P[16]I7). Prophylactic treatment was administered two hours prior to inoculation whereas therapeutic treatment was delivered after viral inoculation, both prior to the symptoms (pre-symptomatic) and once diarrhea had already occurred (post-symptomatic). In all cases, four-day old pups were inoculated with 1778 DD₅₀ murine RVA at PID 0 (Post Inoculation Day 0) and examined daily to assess occurrence of diarrhea and collect feces. Control and treated mice were euthanized sequentially from PID 0 to 6 for prophylactic groups and from PID 0 to 7 for pre-symptomatic and post-symptomatic therapeutic groups. After sacrifice, sera and intestinal samples were collected. **Prophylactic assays:** the efficacy of two doses of VHH was assessed, using four litters of suckling mice for each daily treatment: 160 µg of 2KD1+3B2 (N = 31) and 200 µg of 2KD1+3B2 (N = 30). In both cases the treatment started on PID -1 and was administered until PID 6. On PID 0, the VHH were administered 2 hours prior to viral challenge. Controls included: untreated ECw RVA-inoculated mice (untreated control group); untreated and not RVA-inoculated mice (normal control group). **Pre-symptomatic therapeutic assays:** In order to study the therapeutic effect of 2KD1 and 3B2 against RVA-induced diarrhea, treatment administration started at PID 1 and four VHH daily treatments were tested from PID 1 to 7: 160 µg of 2KD1+3B2 (80 µg of each) (N = 25), 200 µg of 2KD1+3B2 (100 µg of each) (N = 28), 200 µg of 3B2 (N = 24), 200 µg of 2KD1 (N = 30). Included controls were the same as before. For both assays, anti-RVA murine antibodies (Abs) were determined in sera and intestinal samples at PID 0, 7 and 40. Occurrence of an immune response against the VHH was examined by measuring anti-VHH Abs titers at PID 0, 7 and 40 in sera and intestinal samples of treated mice and possible uprising of viral escape mutants to the treatment was assessed by PCR, complete sequencing and phylogenetic analyses of VP6.

Prophylactic administration of both doses of 2KD1+3B2 successfully reduced diarrhea duration and severity as well as intestinal RVA titers and fecal shedding of viral particles. Joint pre-symptomatic therapeutic administration of 2KD1+3B2 (200 µg/dose) successfully reduced diarrhea duration, RVA infection severity and virus shedding in feces. While the same dose of 2KD1 or 3B2 (200 µg) significantly reduced duration of RVA-induced diarrhea, 2KD1 was more effective in diminishing the severity of intestinal infection and RVA shedding in feces. Although both clones showed extensive neutralizing properties against a wide range of RVA strains, 2KD1 required lower concentrations than 3B2 to neutralize some of them, particularly the murine RVA strain used in mice assays. Also, 2KD1 evidenced a three-fold higher affinity for RVA particles (EC₅₀) than 3B2. Neither prophylactic nor pre-symptomatic therapeutic administration of the VHH interfered with the host's humoral immune response against RVA. No viral escape mutants to the VHH treatment were detected. **Post-symptomatic therapeutic assays:** Mouse pups were also inoculated at PID 0 with 1778 DD₅₀ of murine ECw RVA as described and received a daily dose of 200 µg of 2KD1 from PID 2, at which time all mice in the group had already developed diarrhea, to PID 7. When 2KD1 (200 µg) was administered after diarrhea development, it also significantly reduced RVA intestinal infection and fecal shedding. Although treated mice showed a trend towards reducing diarrhea duration, differences with the control group were not significant.

In order to assess the prevention of RVA-induced diarrhea in a model of continuous administration of the VHH, a new assay was conducted, involving transgenic mice that expressed anti-VP6 VHH 2KD1+3B2 in maternal milk regulated under the MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) promoter. In this case, four-day old mice were inoculated with a lower dose of murine RVA (800 DD₅₀) given that VHH levels in maternal milk were lower than in oral treatment experiments. Four litters of transgenic mice fed by transgenic dams were used and four litters of wild type mice fed by wild type dams were employed as control. In order to discard that the transgenesis *per se* could have an effect on the development of RVA disease, a cross-fostering assay was conducted. In this case transgenic pups were fed by wild type dams and vice versa. Neonatal transgenic mice fed by transgenic mothers showed lower severe diarrhea prevalence than the wild type control at PID 3, 4 and 7 and by PID 8 all mice in this group had resolved the symptoms completely. Pups nursed by transgenic dams also reduced intestinal infection with RVA and viral shedding in feces when compared with the control. Regarding cross-fostering experiments, the obtained results were inconsistent. Although mice nursed by transgenic dams successfully reduced diarrhea prevalence when compared with mice nursed by wild type dams, as expected, they showed higher intestinal infection and higher fecal shedding.

To establish if oral administration of anti-VP6 VHH represents an improvement regarding current clinical management of RVA-associated diarrhea, a last experiment in the neonatal mouse model was conducted to compare the efficacy of the VHH against two synthetic drugs (nitazoxanide, Bismuth salicylate) and two aromatic herbal compounds used in folk medicine for the treatment of diarrhea (*Aloysia citrodora*, *Piper aduncum*): 2KD1+3B2 (50 mg/kg) + ORS; 2KD1(50 mg/kg) + ORS, nitazoxanide (15 mg/kg), Bismuth salicylate (750 mg/kg), *A. citrodora* (infusion, 2 g/kg); *P. aduncum* (infusion, 2 g/kg). In this case, anti-VP6 VHH were administered with ORS given that the addition increases proteolytic resistance to gastric enzymes. Four-day old mice were inoculated with 1778 DD₅₀ of murine RVA and assessed daily as described before. The obtained results showed that, with the exception of mice treated with nitazoxanide, all other treatments achieved a significant reduction in diarrhea duration and severity when compared with the untreated control. Regarding intestinal RVA titers, mice administered with anti-VP6 VHH, Bismuth salicylate and nitazoxanide diminished the severity of the infection whereas mice treated with aromatic herbs showed no improvement. Similarly, fecal RVA shedding was only significantly reduced in mice receiving VHH and nitazoxanide but not those treated with other compounds. Our findings show that oral administration of anti-VP6 VHH constitute, not only an effective prophylactic treatment against RVA-associated diarrhea, but also a safe and effective therapeutic tool against RVA infection, even once diarrhea is present. These results suggest that oral administration of anti-VP6 VHH represents a significant improvement in the therapeutic treatment of RVA-associated diarrhea when compared with current available options. Anti-VP6 VHH could be used as a complement to ongoing vaccination, especially in populations that have shown lower immunization efficacy. Overall, oral therapy using anti-VP6 VHH has enormous potential to be implemented in developing countries, where RVA mortality is still high and current vaccines seem less efficacious, and also to be administered to prematurely born or immunosuppressed children worldwide.

Kew words: Rotavirus A, diarrhea, recombinant nanobodies, prevention, therapeutic treatment, BALB/c mice, optimization, viral escape mutants, immunogenicity.

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis Viviana Parreño y Celina Vega, por el espacio y los conocimientos brindados.

A mis compañeros y compañeras de Incuinta, VD y VE por compartir cotidianamente este camino. En especial a Jose, Mari, Celi, Ceci y Chicha por la solidaridad, la ayuda, la tolerancia y los buenos momentos.

A Fátima Torales por la ayuda con el modelo ratón lactante y los conocimientos que generosamente me transmitió.

A mis compañeros y compañeras del Instituto de Virología, por hacer más amenos los días de trabajo. En especial, a Diego Soraire por quien seguimos reclamando justicia.

A mi familia, por su apoyo incondicional y su cariño. A mi abuelo, que ya no está pero nos dejó tanto.

A mis amigos y amigas, porque la vida no sería lo mismo sin ustedes. Los volvería a elegir una y mil veces más. Los adoro.

A mis compañeros y compañeras de militancia, por compartir el camino que guió y guía una gran parte de mi vida. "La vida es hermosa. Que las futuras generaciones la libren de todo mal, opresión y violencia y la disfruten plenamente."

A Dami, por las excursiones al INTA los fines de semana, por soportar las frustraciones y los enojos y acompañar los logros y las alegrías, por compartir ideales y proyectos, por entenderme, bancarme y ofrecerme todo tu amor y alegría. Te amo.

Dedicatoria

A Dami, mi compañero.

Publicaciones originadas de este trabajo de tesis

Maffey L, Vega CG, Miño S, Garaicoechea L, Parreño V. 2016. Anti-VP6 VHH: An Experimental Treatment for Rotavirus A-Associated Disease. *PLoS ONE* 11: e0162351. doi:10.1371/journal.pone.0162351.

Maffey L, Vega CG, Parreño V, Garaicoechea L. 2015. Controlling Rotavirus-associated diarrhea: could Single-domain antibody fragments make the difference? *Rev Argent Microbiol.* 47: 368-379.

Comunicaciones originadas de este trabajo de tesis

XXXVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología

Maffey L, Vega CG y Parreño V. De los saberes populares al laboratorio: propiedades antivirales contra Rotavirus A de dos hierbas usadas tradicionalmente para el tratamiento de la diarrea. Enviado.

I Congreso Argentino de Virología y II Congreso Latinoamericano de Virología

Maffey L, Vega CG, Garaicoechea LL y Parreño V. Nanoanticuerpos VHH anti-VP6 disminuyen la excreción viral y la severidad de la infección por Rotavirus A. Buenos Aires, junio de 2015. Asistencia con presentación de póster.

17th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology

Maffey L, Vega CG, Garaicoechea LL y Parreño V. Prevention and treatment of Rotavirus A using VHH recombinant antibodies. Praga, República Checa, septiembre de 2014. Asistencia con presentación de poster.

XXXIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología

Maffey L, Vega CG, Garaicoechea LL y Parreño V. Ensayos pre-clínicos de Anticuerpos recombinantes VHH para el tratamiento de la infección por Rotavirus Grupo A. Buenos Aires, diciembre de 2013. Presentación Oral.

LVIII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica

Maffey L, Vega CG, Garaicoechea LL y Parreño V. Ensayos pre-clínicos de Anticuerpos recombinantes VHH para el tratamiento de la infección por Rotavirus Grupo A. Mar del Plata, noviembre de 2013. Asistencia con presentación de poster.

ABREVIATURAS

ABTS	[2.2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)]
ABC	Area Bajo la Curva
Ac/s	Anticuerpo/s
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNdc	Ácido ribonucleico doble cadena
CCIF	Del inglés: " <i>Cell Culture Immunofluorescence</i> " Inmunofluorescencia en Cultivo Celular
CO ₂	Dióxido de Carbono
DD ₅₀	Dosis Diarrea 50
DICT	Dosis Infecciosas de Cultivo de Tejido
DPI	Días Post Inoculación
ELISA	Del inglés "Enzyme linked immunosorbent assay" Ensayo por inmunoadsorción ligado a Enzimas
ICTV	Del inglés " <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> " Comité Internacional de Taxonomía de Virus
Ig/Igs	Inmunoglobulina/s
MEM-D	Del Inglés "Dulbecco's Modified Eagle Medium"
PBS	del inglés "Phosphate buffered solution" Solución tampon fosfatada
PCR	Del ingles " <i>Polymerase Chain Reaction</i> " Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Del inglés " <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> " Transcriptasa reversa de la PCR
RVA	Rotavirus Grupo A
SDS	Dodecilsulfato Sódico
SNE	Sistema Nervioso Entérico
SRO	Solución de Rehidratación Oral
UAT	Ultra Alta Temperatura
UFF	Unidades Formadoras de Foco

CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN.....	14
1.1	ROTAVIRUS	14
1.1.1	Epidemiología y transmisión	14
1.1.2	Características generales	15
1.1.3	Clasificación	17
1.1.4	Replicación	18
1.1.5	Patogenia asociada a la infección viral	20
1.1.6	Respuesta inmune frente a RVA.....	23
1.1.7	Rotavirus murino: características generales y modelo de infección	25
1.2	PREVENCIÓN DE LA DIARREA ASOCIADA A ROTAVIRUS A	27
1.3	TRATAMIENTO DE LA DIARREA ASOCIADA A RVA.....	28
1.4	HIERBAS AROMÁTICAS UTILIZADAS POPULARMENTE PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIARREA EN ARGENTINA.....	32
1.5	ANTICUERPOS MONOCLONALES RECOMBINANTES	34
1.5.1	Inmunoglobulinas de camélidos.....	34
1.5.2	Porción variable de anticuerpos de cadena pesada: VHH	36
1.6	NANOANTICUERPOS VHH ANTI-RVA	39
1.6.1	Desarrollo de VHH anti-VP6	39
1.6.2	2KD1 y 3B2: propiedades y perspectivas	40
2.	OBJETIVOS.....	43
2.1	OBJETIVO GENERAL.....	43
2.2	OBJETIVOS PARTICULARES:	43
3.	HIPÓTESIS DE TRABAJO	44
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	45
4.1	PRODUCCIÓN DE VHH ANTI-VP6.....	45
4.2	PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA DIARREA INDUCIDA POR RVA MEDIANTE NANOANTICUERPOS VHH ANTI-VP6 EN EL MODELO RATÓN (BALB/C) LACTANTE.....	46

4.2.1	Obtención del inóculo viral.....	46
4.2.2	Ratones BALB/c y técnicas asociadas.....	47
4.2.3	Ensayos profilácticos.....	48
4.2.4	Ensayos terapéuticos pre-sintomáticos.....	50
4.2.5	Ensayos terapéuticos post-sintomáticos.....	51
4.2.6	Detección de partículas virales infecciosas en contenido intestinal.....	52
4.2.7	Determinación de la excreción viral en materia fecal.....	53
4.2.8	Respuesta inmune humoral anti-RVA.....	54
4.2.9	Estudio de la respuesta inmune humoral anti-VHH del hospedador.....	55
4.2.10	Surgimiento de mutantes de RVA de escape al tratamiento <i>in vivo</i>	56
4.3	PREVENCIÓN DE LA DIARREA INDUCIDA POR RVA EN UN MODELO DE RATONAS TRANSGÉNICAS (B57BL/6 X CBA) FI QUE EXPRESAN 2KD1+3B2 EN LECHE MATERNA.....	59
4.3.1	Desarrollo y caracterización de ratonas transgénicas que expresan VHH anti-VP6 en leche.....	59
4.3.2	Protección frente a RVA de ratones lactantes amamantados por madres transgénicas.....	59
4.3.3	Experimento de cross-fostering.....	60
4.4	CARACTERIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE ANTICUERPOS VHH ANTI VP661.....	
4.4.1	Actividad neutralizante contra RVA.....	61
4.4.2	Afinidad de unión a partículas de RVA.....	62
4.4.3	Resistencia proteolítica en condiciones fisiológicas.....	63
4.4.4	Estabilidad de VHH anti-VP6 en Sales de Rehidratación Oral.....	64
4.4.5	Resistencia térmica.....	65
4.4.6	Resistencia al proceso de liofilización.....	66
4.5	PROPIEDADES ANTIVIRALES DE HIERBAS AROMÁTICAS USADAS POPULARMENTE PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIARREA.....	66
4.6	EFICACIA COMPARATIVA EN EL TRATAMIENTO CONTRA RVA: VHH ANTI-VP6 VS OTRAS OPCIONES TERAPÉUTICAS.....	67
4.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	69
5.	RESULTADOS.....	70

5.1	PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA DIARREA INDUCIDA POR ROTAVIRUS A EN EL MODELO DE RATÓN (BALB/C) LACTANTE POR VHH ANTI-VP6	70
5.1.1	Tratamiento profiláctico	70
5.1.2	Tratamiento terapéutico pre-sintomático.....	73
5.1.3	Tratamiento terapéutico post-sintomático	78
5.1.4	Respuesta humoral anti-VHH del hospedador al tratamiento oral.....	80
5.1.5	Inmunogenicidad sistémica de los VHH anti-VP6	81
5.1.6	Surgimiento de mutantes virales de escape al tratamiento con VHH <i>in vivo</i>	82
5.2	PREVENCIÓN DE LA DIARREA INDUCIDA POR RVA EN UN MODELO DE RATONAS TRANSGÉNICAS (B57BL/6 X CBA) F1 QUE EXPRESAN VHH ANTI-VP6 EN LECHE MATERNA.....	84
5.2.1	Detección de VHH anti-VP6 en leche de ratonas transgénicas.....	84
5.2.2	Efecto de la ingesta continua de leche materna con VHH anti-VP6 en ratones lactantes infectados con RVA murino.....	85
5.2.3	Experimentos de cross-fostering.....	87
5.3	CARACTERIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE NANO ANTICUERPOS VHH ANTI-VP6	90
5.3.1	Actividad neutralizante contra RVA.....	90
5.3.2	Afinidad de unión a partículas de RVA.....	91
5.3.3	Ensayos de resistencia proteolítica en condiciones fisiológicas.....	92
5.3.4	Estabilidad de VHH anti-VP6 en Sales de Rehidratación Oral	97
5.3.5	Resistencia térmica	98
5.3.6	Resistencia al proceso de liofilización.....	99
5.4	PROPIEDADES ANTI-RVA DE HIERBAS AROMÁTICAS.....	101
5.5	EFICACIA COMPARATIVA EN EL TRATAMIENTO DE RVA: VHH ANTI-VP6 VS OTRAS OPCIONES TERAPÉUTICAS	101
6.	DISCUSIÓN.....	107

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ROTAVIRUS

1.1.1 Epidemiología y transmisión

En el año 2013 se registraron 6,3 millones de muertes de niños menores de 5 años alrededor del mundo [1]. Las enfermedades diarreicas continúan representando una de las causas primordiales de morbilidad y mortalidad infantil a nivel mundial y durante ese año fueron responsables de la muerte de 578.000 niños menores de cinco años, correspondiendo al 9,2% del total de defunciones en este grupo etario [2]. Los Rotavirus del grupo A (RVA) constituyen el principal agente de la gastroenteritis infantil, causando cada año alrededor de 25 millones de consultas médicas, 2 millones de admisiones hospitalarias y entre 180.000 y 450.000 muertes en niños menores de 5 años [3,4]. Si bien la infección por RVA es endémica en todo el mundo, la mayor parte de las muertes generadas por este agente infeccioso ocurren en países en vías de desarrollo [5]. África Sub-sahariana y el Sudeste asiático concentran el 90% de las muertes por RVA, principalmente por la imposibilidad de vastos sectores de la población de acceder a los sistemas de salud, incluyendo a terapias básicas de rehidratación oral [5]. Adicionalmente, en los países en vías de desarrollo, las gastroenteritis causadas por RVA tienden a presentarse en niños más pequeños (antes del primer año de vida) y como co-infección con otros patógenos entéricos [5]. En Argentina, se estima que RVA causa cada año más de 200.000 casos de diarrea y entre 30 y 50 muertes en niños menores de 5 años [6].

RVA presenta características que lo hacen altamente infeccioso así como finamente adaptado a su huésped. A diferencia de otros patógenos entéricos, las partículas virales infecciosas subsisten en climas templados y tropicales y presentan alta estabilidad en ambientes húmedos [7]. La vía de transmisión principal es la ruta fecal-oral, si bien se ha sugerido que la vía respiratoria podría cumplir un rol en la diseminación [8]. La excreción de RVA en heces puede alcanzar las 10^{10} partículas por gramo, habiéndose establecido la mínima dosis infectiva en 10 partículas virales [9]. En climas templados, la gastroenteritis por RVA se presenta en forma estacional, concentrándose la mayor prevalencia en los meses más secos y fríos [10]. Tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, prácticamente todos los niños de entre 3 y 5 años de edad han sufrido al menos una

infección por RVA. Las infecciones neonatales pueden ocurrir pero son asintomáticas o presentan menor severidad, debido a la protección conferida por los anticuerpos pasivos maternos [5]. Si bien las infecciones recurrentes son frecuentes, los síntomas son menos severos con cada infección subsecuente. En pacientes adultos, las infecciones por RVA son usualmente subclínicas, aunque pueden presentar mayor severidad en pacientes inmunocomprometidos o adultos mayores [11].

En la actualidad, RVA es incluido dentro del gran grupo de patógenos de los cuales se cree que nunca serán completamente erradicados, dado que en particular no genera inmunidad esterilizante y es capaz de infectar huéspedes animales, generando constantemente la aparición de nuevas cepas virales. Por ello, se postula que un objetivo razonable en la lucha contra este agente infeccioso es eliminar o al menos disminuir la sintomatología clínica asociada a la infección viral, sin prevenir completamente la misma y reducir al mínimo los casos fatales [12].

1.1.2 Características generales

Los Rotavirus constituyen un género dentro de la familia *Reoviridae* (género Rotavirus). Las partículas virales maduras miden aproximadamente 100 nm de diámetro y están constituidas por una cápside proteica icosaédrica desnuda (sin envoltura lipídica) con seis proteínas organizadas en tres capas concéntricas. Esta estructuración le otorga a Rotavirus la apariencia de rueda (del latín, *rota*) al microscopio electrónico (Fig. 1).

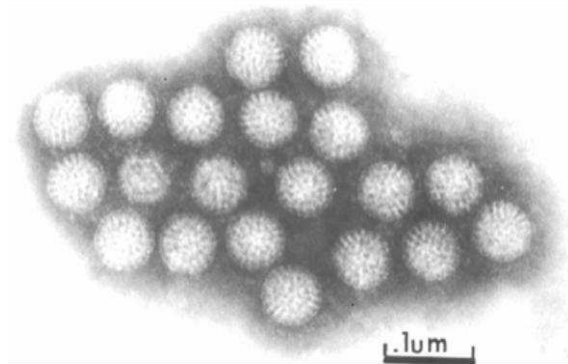


Figura 1. Partículas de Rotavirus. Fotografía obtenida por microscopía electrónica de partículas de Rotavirus bovino detectadas en heces de terneros con diarrea (Fuente: LJ Saif, FAHRP-OARDC, OSU, EE.UU.).

El genoma viral está compuesto por 11 segmentos de ácido ribonucleico doble cadena (ARNdc) que codifican para seis proteínas estructurales -VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7- y seis proteínas no estructurales - NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6-. [13]. A excepción de NSP5 y NSP6, cuyos marcos de lectura se superponen, cada proteína se encuentra codificada por un único segmento del genoma viral [13].

El *core* (capa interna) está constituido por la proteína VP2 y que contiene el genoma viral y el complejo RNA polimerasa (VP1 y VP3) (Fig. 2). La capa intermedia posee una superficie rugosa, organizada en 260 trímeros de la proteína VP6, la cual es el componente mayoritario del virión (60% de la masa total) así como el más inmunogénico del virus. Esta proteína cumple una importante función en la estabilidad estructural del mismo, dada su interacción con las proteínas de la cápside externa y del *core* [14]. La superficie de la cápside externa está formada por la glicoproteína VP7, que constituye el 30% del virión, participa en el enlace inicial del virus a la célula y es el principal antígeno neutralizante. Por otra parte, las espículas están formadas por VP4, que constituye el 1,5% de la masa viral y cumple diversas funciones: es una proteína sensible a proteasas que se cliva en dos subunidades, VP5* y VP8*, por la pancreatina intestinal; presenta actividad de hemaglutinina; porta epitopes neutralizantes específicos y participa en la absorción y penetración del virus a la célula. *In vitro*, esta proteína participa en la unión del virus a las células, produce restricción del crecimiento de determinadas cepas de RVA en los cultivos celulares, promueve la formación y tamaño de placas de lisis [15].

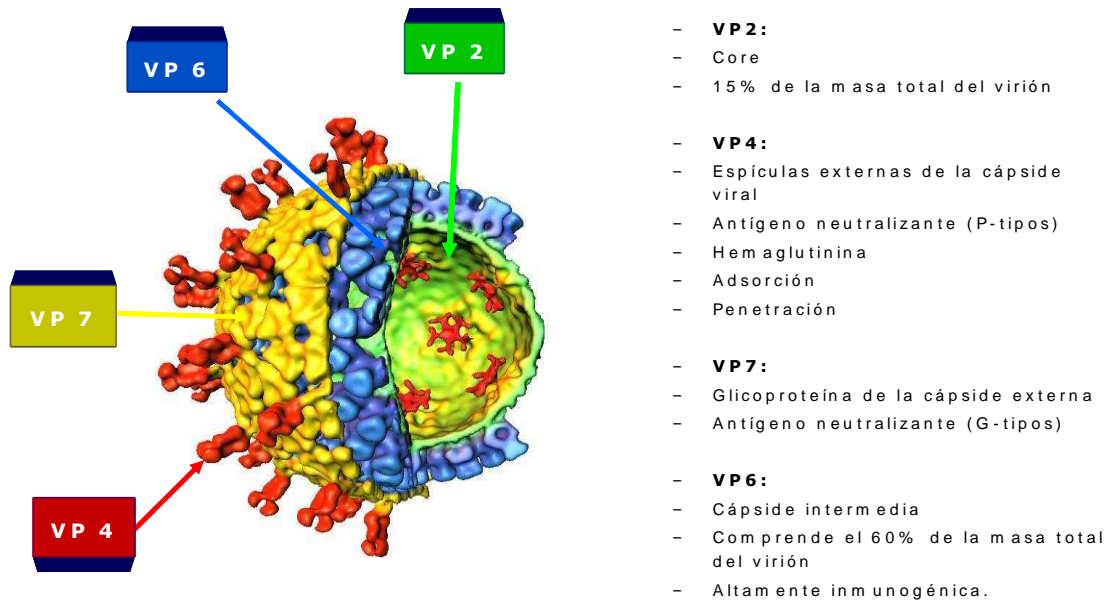


Figura 2. Estructura tridimensional de una partícula viral de Rotavirus. Imagen obtenida por análisis de crio-electro-microscopía y procesamiento computarizado [16]

1.1.3 Clasificación

De acuerdo a los lineamientos establecidos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés), los Rotavirus pueden clasificarse en 7 grupos (A-G) en base a propiedades antigénicas de la proteína VP6 [17]. Los grupos A, B y C infectan a los seres humanos y a una gran variedad de especies animales, mientras que los grupos D-G han sido identificados únicamente en animales, particularmente en especies de aves [18]. RVB ha causado epidemias de diarrea severas en pacientes adultos en China e India mientras que RVC ha sido asociado esporádicamente a muestras de niños con diarrea [12,13,17] y muestras de origen porcino [19–21]. Sin embargo, desde un punto de vista epidemiológico RVA constituye el principal agente etiológico de infección y patogenia en seres humanos, por lo que ha sido clasificados utilizando diversos enfoques [22].

Inicialmente, la clasificación más utilizada de RVA se basaba en las propiedades antigénicas de VP6, VP7 y VP4: subgrupos, G-serotipos y P-serotipos respectivamente. La asignación de los serotipos de VP7 y VP4 se efectuaba mediante ensayos de seroneutralización cruzada usando sueros hiperinmunes serotipo-específicos. Debido al

creciente acceso a técnicas de secuenciación, la clasificación antigénica ha sido reemplazada paulatinamente por un nuevo sistema de clasificación basado en los genotipos virales de VP7 y VP4 [22]. Hasta el momento, este sistema ha permitido la identificación de 32 G-genotipos y 47 P-genotipos [23]. Mientras que los G-genotipos muestran una alta correspondencia con la anterior clasificación en G-serotipos, en el caso de los P-genotipos esta relación es más compleja. Por este motivo, se ha establecido una nomenclatura dual para la clasificación antigénica y genética de VP4: el P-serotipo se denota por un número arábico (a veces seguido de una letra mayúscula) mientras que el P-genotipo se escribe a continuación como un número arábico entre corchetes [22].

Actualmente, las cepas de cuatro combinaciones de G-P tipos son responsables de alrededor del 90% de los casos de diarrea asociada a RVA a nivel mundial: G1[P8], G2[P4], G3[P8] y G4[P8] [24,25]. En Latinoamérica, si bien la distribución global es similar, la cepa G9[P8] juega un rol epidemiológico preponderante [24]. En los últimos años, se ha reportado la emergencia de casos asociados a cepas del genotipo G12 en combinación con [P8] o [P6] [26,27]. La recombinación por reasociaciones de las cepas humanas con cepas animales es fundamental en la aparición de nuevas variantes virales. En el 2008, Matthijnssens y colaboradores [28] demostraron que las cepas de RVA humano más prevalentes a nivel mundial incluidas en el grupo Wa-like (G1P[8], G3P[8], G4P[8] y G9P[8]) poseían un ancestro común con cepas de origen porcino mientras que las cepas pertenecientes al grupo DS1-like (principalmente G2P[4]) compartían un origen común con cepas bovinas. Estos hallazgos refuerzan la necesidad de monitorear conjuntamente la circulación de cepas humanas y animales en vistas al potencial zoonótico de estas últimas.

1.1.4 Replicación

Rotavirus infecta a los enterocitos maduros de la porción apical de las microvellosidades intestinales mientras que las células de la cripta no son afectadas. Si bien los mecanismos de infección de este patógeno no han sido completamente elucidados, se considera que los enterocitos maduros expresarían factores necesarios para una infección/replicación exitosa de Rotavirus [7]. La unión a la célula blanco está mediada inicialmente por la unión de VP4 o VP8* a receptores de superficie que contienen ácido siálico [14]. Para la unión del virus a la célula no es necesario un cambio

conformacional en VP4. Sin embargo, para los pasos de unión posteriores es necesario el clivaje de VP4 (en VP8* y VP5*) mediado por la tripsina intestinal que permite la interacción de VP5* (situada en la base de las espículas) con co-receptores celulares [7]. A continuación, la capa externa es removida por completo y el virus ingresa al citoplasma celular como una partícula doble cápside [7]. El mecanismo de entrada a la célula aún presenta controversias. Dos modelos principales han sido propuestos: por fusión directa o por endocitosis dependiente de Ca²⁺ [15]. Este último modelo es el más aceptado actualmente y se basa en la endocitosis del virus en presencia de bajas concentraciones celulares de Ca²⁺, lo que genera el flujo de iones desde el endosoma hacia el citoplasma. Cuando las concentraciones se igualan, la concentración de iones dentro del endosoma disminuye por debajo del nivel crítico que requiere la cápside externa y el virus se desprende de las proteínas externas y escapa al citoplasma previa lisis de la membrana del endosoma [29] (Fig. 3).

Las partículas virales doble cápside poseen la doble capacidad de transcribir los genes codificantes de las proteínas virales y replicar el genoma viral ARNdc para las nuevas partículas mediante un complejo ARN polimerasa ARN-dependiente, formado por VP1 y VP3 [14]. Los ARN mensajeros (con CAP) son traducidos en el citoplasma, dando lugar a las proteínas virales. La replicación del genoma viral está circunscripta al interior de estructuras especializadas denominadas viroplasmos, localizadas en las cercanías del núcleo celular y el retículo endoplásmico (Fig. 3) [7]. Una vez sintetizadas las partículas virales doble cápside, éstas son transportadas al retículo endoplásmico. Este proceso se inicia por la unión de las partículas doble cápside sintetizadas a la porción citoplásmica de la proteína no estructural NSP4, que constituye una glicoproteína transmembrana del RE [7]. En este proceso, los viriones doble cápside reciben una envoltura transitoria que luego pierden al entrar al retículo endoplásmico. Las proteínas de la cápside externa son incorporadas mediante rearrreglos proteicos y las partículas triple cápside son liberadas mediante lisis celular o por una vía de transporte vesicular no tradicional independiente del aparato de Golgi (Fig. 3) [14].

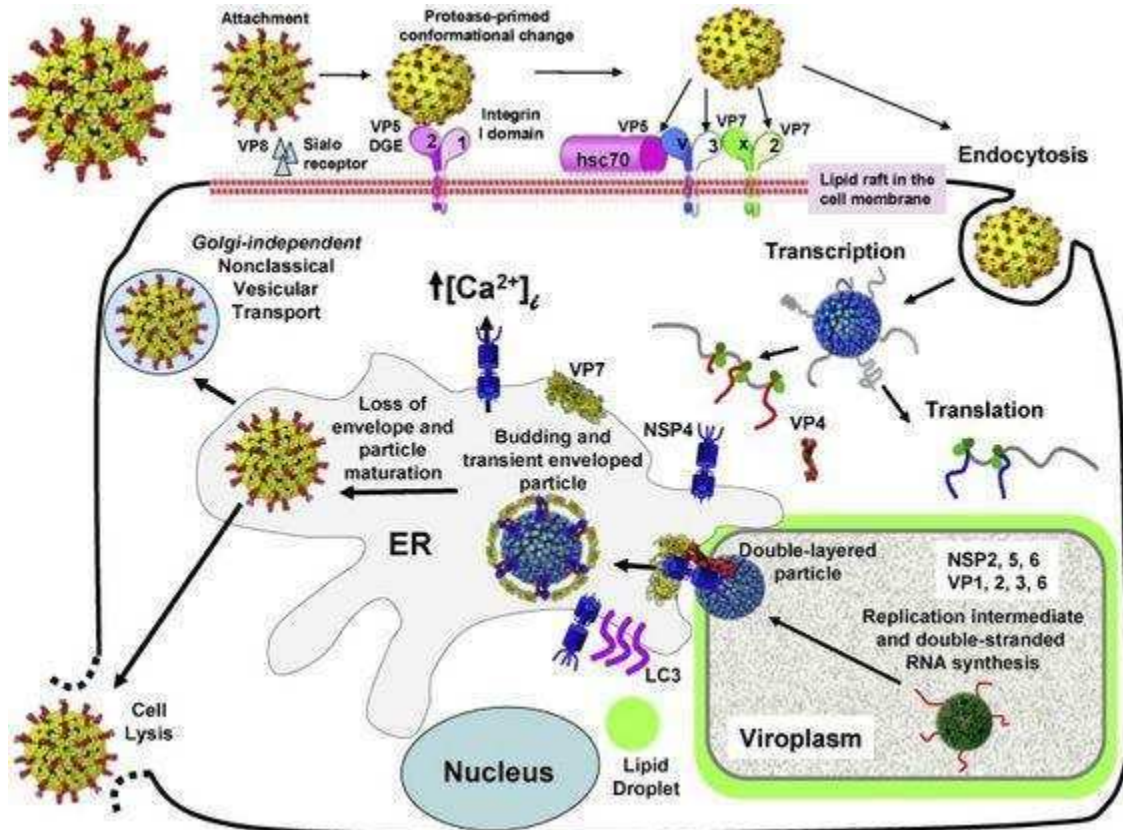


Figura 3. Esquema general del ciclo de replicación de Rotavirus. La unión a la célula blanco ocurre por la interacción entre VP4/VP8* con receptores con ácido siálico. La entrada a la célula mediante endocitosis mediada por receptor requiere el clivaje de VP4, permitiendo la interacción de VP5* con otros co-receptores celulares. La menor concentración de Ca^{2+} en el endosoma permite la liberación de las partículas infecciosas doble-cápside. Los RNA mensajeros virales son utilizados para la traducción de proteínas virales en el citoplasma y la replicación del genoma viral dentro de estructuras especializadas denominadas viroplasmos. Las partículas doble-cápside se trasladan con una envoltura provisoria al retículo endoplásmico por unión a la proteína viral NSP4 que se encuentra anclada a la membrana del mismo. Dentro del retículo se ensamblan las proteínas externas VP7 y VP4 y las partículas virales son liberadas mediante lisis celular o por transporte de vesículas independiente del Aparato de Golgi [14].

1.1.5 Patogenia asociada a la infección viral

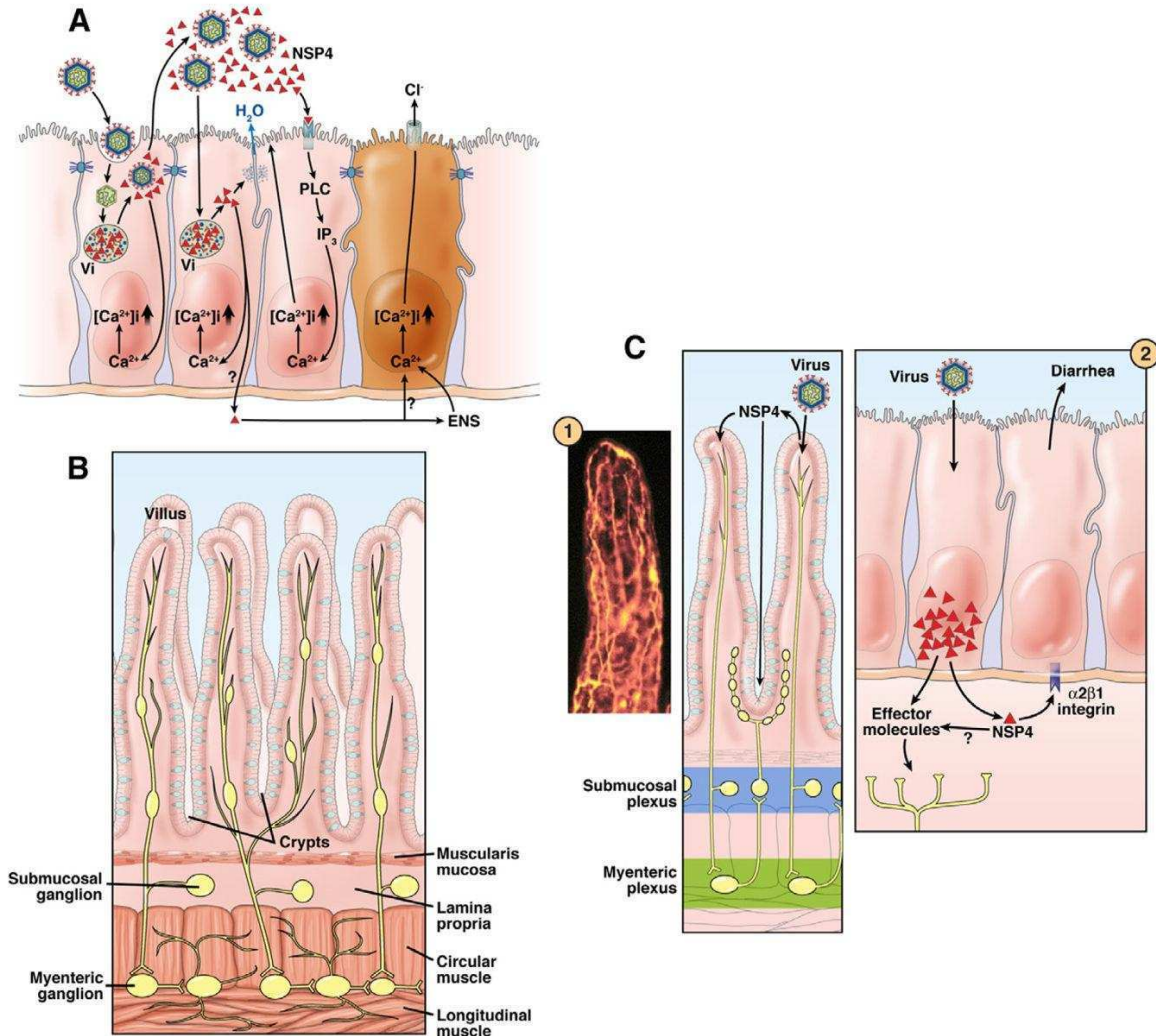
Durante la gastroenteritis inducida por RVA, las partículas virales infectan a los enterocitos maduros situados en las microvellosidades intestinales. Aunque el intestino

delgado es el sitio de replicación viral excluyente del patógeno, estudios previos demostraron la existencia de viremia y replicación viral limitada en distintos órganos [30–32] aunque no está claro si esta diseminación sistémica se asocia a síntomas patogénicos específicos en hospedadores normales. La diarrea representa la manifestación clínica principal de la infección por RVA en niños menores de 5 años [7]. Un factor clave que diferencia la diarrea por RVA de las diarreas causadas por agentes bacterianos es la escasa inflamación que se observa en los tejidos intestinales afectados [7]. En modelos animales, la infección puede causar cuadros clínicos de variada severidad que van desde lesiones leves, como la vacuolización o pérdida de enterocitos, hasta cambios histopatológicos severos como atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas [14].

La patogénesis de la diarrea inducida por RVA es multifactorial. Por un lado, la infección genera diarrea malabsortiva debido a la destrucción de enterocitos, el silenciamiento viral de vías de producción de enzimas que regulan la absorción intestinal y los cambios funcionales en las uniones estrechas entre los enterocitos [7] (Fig. 4). La malabsorción provoca el tránsito de mono/disacáridos, carbohidratos, grasas y proteínas no digeridas hacia el colon. El bolo no digerido resulta osmóticamente activo y el colon no logra absorber suficiente agua, lo que genera la ocurrencia de una diarrea osmótica [13]. Por otra parte, existe un componente secretorio de la diarrea por RVA que está mediado por la activación del sistema nervioso entérico (SNE) y por la acción de NSP4. La proteína viral NSP4 actúa regulando la homeostasis celular de calcio y funciona como una enterotoxina [7]. La salida de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, regulada entre otros factores por NSP4, genera un aumento de la concentración intracelular que desencadena una serie de procesos celulares, incluyendo la disrupción del citoesqueleto de las microvellosidades, la reducción en la expresión de enzimas digestivas, la inhibición de sistemas de co-transporte de sodio y necrosis [13]. Si bien la acción de NSP4 se encuentra asociada primordialmente a su rol en la disrupción de la homeostasis celular del Ca^{2+} , también se ha vinculado a esta proteína viral con un aumento en la activación de canales celulares de Cl^- , lo que genera un aumento en la secreción de Cl^- y, en consecuencia, de agua (Fig. 4).

El rol fundamental de NSP4 en la generación de la diarrea inducida por RVA ha sido comprobado *in vivo*. La inoculación oral con los residuos aminoacídicos 114-134 de NSP4 recombinante generó diarrea y el surgimiento de una respuesta inmune humoral del hospedador contra la enterotoxina viral en el modelo de ratón lactante [33]. En el mismo sentido, tanto pacientes pediátricos infectados naturalmente con RVA como niños

vacunados contra RVA desarrollaron una respuesta inmune humoral y celular hacia estos mismos residuos de NSP4 [34]. Como se mencionó previamente, NSP4 también actúa sobre el sistema nervioso entérico. Resultados previos de experimentos en ratones determinaron que alrededor del 67% de la pérdida de fluidos y electrolitos durante la



diarrea por RVA se debe a la activación del SNE [35].

Figura 4. Algunos de los mecanismos por los cuales se genera la diarrea inducida por RVA.

A. Los eventos que ocurren a partir de la infección viral se muestran en orden, de izquierda a derecha (no todos los eventos se muestran en todas las células). 1) Infección de la célula blanco inicial, entrada, desnudamiento viral, transcripción y traducción de proteínas virales, formación de viroplasmas y liberación de partículas y proteínas virales (NSP4, triángulos rojos) por una vía secretoria no tradicional. NSP4 induce la liberación de Ca²⁺ aumentando la concentración intracelular. 2) Otra de las consecuencias de la infección por RVA: NSP4 daña las uniones

celulares estrechas, permitiendo el flujo paracelular de agua y electrolitos (flecha azul). 3) NSP4 liberada de otras células infectadas se une a un receptor específico y activa una cascada de señales que genera un aumento del Ca^{2+} intracelular, lo que genera daños en el citoesqueleto de las microvellosidades. 4) NSP4 puede interactuar en forma directa con células de la cripta (marrón) o estimular el sistema nervioso entérico (SNE) lo que provoca un aumento en la concentración de Ca^{2+} e induce la secreción de iones Cl^- . **B.** Arquitectura normal del intestino delgado, sin mostrar el sistema circulatorio, evidenciando las terminaciones del SNE. **C.** Arco reflejo del SNE que recibe señales del epitelio de las vellosidades y activa el epitelio de las criptas. El inserto 1 es una muestra histológica de intestino de ratón adulto donde se muestra la rica inervación de la zona (amarillo). El inserto 2 muestra la interacción entre enterocitos infectados y el SNE mediante la acción de NSP4 y otros efectores. La integrina $\alpha 2\beta 1$ puede unirse a NSP4 y generar diarrea en ratones lactantes [7].

1.1.6 Respuesta inmune frente a RVA

Las infecciones por RVA pueden ocurrir secuencialmente en los seres humanos desde el nacimiento hasta edades avanzadas. Sin embargo, las consecuencias clínicas de la infección se encuentran fuertemente determinadas por la edad de los pacientes [15]. Como se mencionó previamente, las infecciones en neonatos no suelen producir síntomas evidentes debido a la protección de los anticuerpos maternos transplacentarios. Estudios sobre infecciones naturales por RVA en pacientes pediátricos demostraron por primera vez la existencia de inmunidad adquirida tanto a enfermedades recurrentes como, en menor medida, a la reinfección luego de la primoinfección [36]. Esta protección aumenta con cada nueva infección del mismo serotipo, aunque la ocurrencia de protección heterotípica ha sido reportada. Existen varias hipótesis referentes a los mecanismos subyacentes en este fenómeno incluyendo el reconocimiento de epitopes compartidos entre diferentes variantes de VP4 y VP7 por parte de la inmunoglobulina IgA secretoria local, a nivel de la mucosa intestinal, la protección mediada por anticuerpos dirigidos contra la proteína de cápside intermedia VP6 o la acción de linfocitos T citotóxicos específicos para RVA con reactividad cruzada [15].

El estudio detallado de la respuesta inmune contra RVA en pacientes pediátricos presenta obvias limitaciones, por lo que los distintos modelos animales, en particular el modelo murino, han sido fundamentales en el estudio de los mecanismos específicos operantes [12]. En relación al modelo ratón, numerosos trabajos previos han abordado un

análisis detallado de la respuesta inmune humoral anti-RVA en este hospedador [37]. En primer lugar, los antígenos virales reconocidos a nivel de la mucosa intestinal generan la activación de células B productoras de IgM anti-RVA en las Placas de Peyer y en los nódulos linfáticos mesentéricos (hacia los 4 días post-inoculación –DPI-), extendiéndose luego a la lámina propia intestinal y el bazo (7 DPI) [37]. Al mismo tiempo, comienzan a detectarse también células B productoras de anticuerpos IgA e IgG anti-RVA, aunque con una clara predominancia de células secretoras de IgA en lámina propia. A nivel de las Placas de Peyer, se observaron asimismo células productoras tanto de IgG como de IgA anti-RVA, aunque este último isotipo fue el predominante [37]. A largo plazo (9 meses post-inoculación), se determinó una localización mayoritaria de células productoras de IgA anti-RVA en las Placas de Peyer y la lámina propia mientras que las células secretoras de IgG anti-RVA se encontraron primordialmente en el bazo y la médula ósea [37]. El compartimento sistémico de la respuesta inmune humoral del hospedador se activa a partir de los antígenos virales presentes en sangre periférica, aunque esta última vía no sería determinante en el control de la infección [12].

Los conocimientos obtenidos a partir de ensayos en modelos animales han permitido establecer un esquema general de la respuesta inmune humoral en seres humanos (Fig. 5), que involucra tanto la respuesta nivel local como sistémica. A nivel de la mucosa intestinal, las propiedades antivirales de las células secretoras de anticuerpos anti-RVA con receptores específicos en la lámina propia y Placas de Peyer han sido explicadas mediante dos mecanismos: la expulsión y la exclusión [38]. La expulsión ocurriría cuando los anticuerpos IgA se unen a VP6 durante la transcitosis desde la membrana basolateral al lumen intestinal y “expulsan” el virión hacia el lumen (Fig. 5). La exclusión, es decir la capacidad de impedir la infección *de novo* de enterocitos, ocurre por la presencia de anticuerpos contra VP4 y/o VP7 en el lumen intestinal. Por otra parte, la presencia de anticuerpos contra NSP4 bloquea la generación de diarrea, aunque no la infección, mediante su efecto anti-enterotoxina [33].

Si bien los anticuerpos IgA anti-RVA intestinales representan la principal vía de protección, la producción de anticuerpos específicos anti-RVA IgG o IgM en médula ósea y bazo que pueden acceder al intestino desde el suero mediante receptores específicos, puede aportar a la protección contra este patógeno [12]. De la misma forma, parte de los anticuerpos IgA con localización intestinal puede pasar al suero, generando así un correlato sistémico de lo que ocurre a nivel local (Fig. 5). Esta última característica resulta

de gran utilidad a la hora de evaluar el grado de protección de vacunas anti-RVA en pacientes pediátricos.

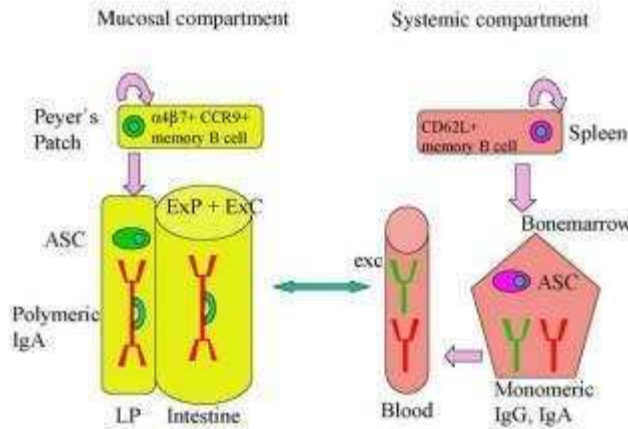


Figura 5. Esquema general de la respuesta inmune anti-RVA en humanos. Los antígenos de RVA activan dos compartimentos del sistema inmune. Por un lado, los antígenos virales presentes en las Placas de Peyer inducen la generación de células B de memoria con receptores específicos que permiten que estas células circulen por sangre y retornen al intestino. A la vez, producen células secretoras de IgA polimérica con receptores en la lámina propia intestinal. Estos anticuerpos median la expulsión (ExP) y la exclusión (ExC) viral. Por otra parte, los antígenos sistémicos de RVA estimulan la activación de células B de memoria con receptores en el bazo que permiten que estas células circulen por sangre y retornen, y células productoras de anticuerpos con receptores en médula ósea que secretan IgA e IgG monoméricos. Estos anticuerpos son la fuente esencial de los anticuerpos séricos. Sin embargo, la flecha indica que los compartimentos no son estancos sino que existe traspaso de anticuerpos de una a otra vía [12].

1.1.7 Rotavirus murino: características generales y modelo de infección

En 1946, Cheever y Mueller [39] describieron por primera vez una enfermedad infecciosa en una colonia de ratones de laboratorio cuyo manifestación clínica prominente era la ocurrencia de diarrea severa. Si bien describieron acabadamente los signos clínicos, no lograron aislar el agente etiológico, aunque sugirieron que se trataba de un virus [39]. En una serie de estudios iniciados en 1957, Kraft demostró la naturaleza infectiva y transmisible del patógeno e introdujo el término Diarrea Epizoótica de Ratones

Lactantes, EDIM por sus siglas en inglés [40,41]. Posteriormente, Adams y Kraft [32] confirmaron que se trataba de un agente viral utilizando técnicas de microscopía electrónica y describieron las lesiones que causaba en los enterocitos afectados. Finalmente, en 1969 Wilsnack y colaboradores detectaron antígenos de Rotavirus en el intestino de ratones infectados usando técnicas de inmunofluorescencia [42].

El modelo ratón lactante para la infección con RVA fue desarrollado en estudios iniciales que buscaban un modelo animal confiable que asemejara la infección por RVA en pacientes pediátricos [43]. Los ratones neonatos son susceptibles a infección y diarrea inducida por las cepas murinas de RVA hasta los 14 días de vida, y también pueden ser infectados con cepas heterólogas. Sin embargo, la virulencia de las cepas heterólogas y su habilidad para dispersarse entre individuos susceptibles está reducida significativamente en comparación con las cepas homólogas [44]. A modo de ejemplo, la dosis de RVA símico requerida para inducir diarrea en ratones lactantes es alrededor de 10^5 - 10^6 veces mayor que la dosis de RVA murino [45]. Por otra parte, las restricciones involucradas en la relación RVA-hospedador murino presentan aspectos multigénicos en los cuales una replicación entérica eficiente requiere una constelación de genes murinos: VP3, NSP2, NSP3, NSP120 [44]. En este sentido, el modelo ratón lactante infectado con cepas homólogas de RVA continúa siendo uno de los principales modelos para evaluar estrategias de prevención o tratamiento de RVA para su posterior uso en pacientes pediátricos [46].

Los ratones lactantes infectados experimentalmente con RVA murino desarrollan diarrea dentro de los 2 días post-inoculación (DPI) [47,48]. Las heces adquieren un color amarillento, pierden consistencia y muchas veces presentan restos de mucus en los casos más severos. En ratones desafiados y no tratados con terapias anti-RVA, los síntomas pueden extenderse hasta 8/10 DPI aunque la severidad de la diarrea puede presentar alta variación entre camadas de un mismo grupo experimental [47] y es dependiente de las dosis viral inoculada. Otros signos clínicos de la gastroenteritis inducida por RVA son letargia, distensión del abdomen y acumulación de fluido en el intestino delgado [15,47]. La detección de antígenos virales a nivel intestinal ocurre a partir del primer día posterior a la inoculación aunque se resuelve antes de la desaparición de la diarrea, mientras que la excreción de partículas virales en las heces puede persistir hasta 7 DPI [47].

En relación a los síntomas histopatológicos, los ratones lactantes infectados con RVA murino presentan una elevada vacuolización de los enterocitos afectados [48],

aunque esta característica ha sido atribuida a la naturaleza de la respuesta inmune del hospedador y no a la cepa viral, dado que se observa en ratones infectados con cepas heterólogas [49]. La vacuolización se presenta con mayor frecuencia en los enterocitos ubicados en los extremos de las vellosidades. A diferencia de otras especies, la atrofia de las vellosidades no se observa con frecuencia en los ratones infectados, a pesar de la severidad del cuadro clínico [15]. La ausencia de daños patológicos intestinales extendidos y la observación de enterocitos vacuolizados pero sin presencia de replicación viral, llevaron a Osborne y colaboradores [50] a proponer que, en el modelo murino, la pérdida de fluidos por diarrea es una consecuencia secundaria a una isquemia local de las vellosidades. Estudios previos han planteado que NSP4 podría jugar un rol preponderante en la virulencia de las cepas murinas y en la aparición de la diarrea en ratones infectados [51,52]. La administración de NSP4 de una cepa murina a ratones lactantes generó síntomas diarreicos aún en ausencia de partículas virales completas [51]. Al igual que con las cepas de RVA humano, a la fecha no han sido elucidados por completo los mecanismos intervinientes en la diarrea inducida por RVA murino en el hospedador homólogo.

1.2 PREVENCIÓN DE LA DIARREA ASOCIADA A RVA

Actualmente, los principales esfuerzos para la prevención de RVA se centran en ampliar la cobertura de la vacunación y aumentar la eficacia de las vacunas existentes en poblaciones de riesgo. La estrategia de prevenir la diarrea asociada a RVA mediante la vacunación proviene de diversos estudios que demuestran que la infección natural con el patógeno induce inmunidad frente a infecciones subsecuentes [53–55]. La infección primaria por RVA confiere una protección frente a las gastroenteritis causadas por el mismo serotipo y mitiga la severidad del cuadro clínico durante la infección con otros serotipos [56].

En 1998, se aprobó en Estados Unidos la aplicación de una vacuna tetravalente a virus vivo atenuado (RotaShield, Wyeth Laboratories) compuesta por fragmentos recombinantes de RVA animales (G3, Rhesus) y humanos (G1, G2, G4). Sin embargo, poco tiempo después de su lanzamiento la vacuna fue retirada debido a la asociación hallada entre su aplicación y la ocurrencia de intususcepción intestinal [57]. Desde el año 2006, se encuentran disponibles otras dos vacunas orales a virus vivo atenuado: Rotarix

(GlaxoSmithKline Biologicals), una vacuna monovalente que contiene una única cepa de origen humano G1P[8] y RotaTeq (Merck), una vacuna pentavalente con virus recombinante que combina un esqueleto genómico bovino y las variantes de VP7 y VP4 de las principales cepas humanas G1-G4, P[8].

Ambas vacunas mostraron elevada eficiencia en la prevención de la diarrea severa asociada a RVA en países desarrollados [56,58–60] y algunos países en desarrollo [59,61,62]. Sin embargo, la seguridad y eficacia de las vacunas contra RVA en poblaciones de riesgo continúan siendo deficientes [56,63,64]. Existen diversos factores que afectan la eficacia y desempeño de las vacunas orales en áreas empobrecidas, incluyendo aspectos nutricionales como la malnutrición y la deficiencia de zinc, la presencia de enteropatógenos que compiten con la vacuna, alteraciones en la mucosa intestinal debido a enteropatías persistentes [65] y los altos niveles de anticuerpos en la leche materna y la amplia costumbre de alimentación de los lactantes con leche de pecho en lugar de mamadera [65,66]. Estudios recientes determinaron que la deficiencia prenatal de vitamina A podría alterar la respuesta inmune innata durante la vacunación contra RVA [67,68]. Por otra parte, los pacientes pediátricos que presentan inmunodeficiencia combinada severa pueden sufrir infecciones por RVA y diarrea asociadas a la vacunación, así como cuadros de excreción crónica [69].

Al margen de la disparidad en los resultados obtenidos, la Organización Mundial de la Salud recomienda la inmunización de rutina contra RVA de todos los niños menores de 5 años [70]. Resulta entonces primordial la optimización de la eficacia, la seguridad y el acceso a las vacunas en las poblaciones de riesgo [64] a la vez que se desarrollan nuevas estrategias de inmunización pasiva complementarias o alternativas a la vacunación. Recientemente, una nueva vacuna a virus vivo atenuado (Rotavac, G9P[11]) desarrollada en India ha completado la Fase Clínica III [71]. Rotavac es más económica que las vacunas existentes (US\$ 1 versus US\$ 15 por dosis) por lo que su aprobación implicaría una mejora sustancial en el acceso de países en vías de desarrollo a la vacunación masiva contra RVA [71].

1.3 TRATAMIENTO DE LA DIARREA ASOCIADA A RVA

Las estrategias de tratamiento para la infección con RVA son inespecíficas y primordialmente basadas en la sintomatología. El manejo clínico recomendado se basa en

prevenir la deshidratación mediante la administración de Sales de Rehidratación Oral (SRO), suplementación con zinc y la re-introducción temprana de alimentos [72] que ayuda a la reparación de la mucosa dañada [73]. El uso de SRO implicó una reducción sustancial de las muertes provocadas por diarrea en los países en vías de desarrollo. Sin embargo, esta terapia no reduce la duración ni la severidad de los síntomas diarreicos. Si bien la vacunación ha reducido la carga de morbilidad de la diarrea asociada a RVA, el impacto de esta patología, particularmente en áreas donde la vacuna no está disponible o es menos efectiva, requiere otras modalidades de tratamiento terapéutico como complemento a las SRO, en vistas a reducir la severidad y duración de la diarrea [73].

Actualmente, existen diversas opciones terapéuticas propuestas para el tratamiento de la diarrea aguda por RVA, pero pocas de ellas cuentan con las pruebas de eficacia necesarias para analizar su aplicación de rutina en pacientes pediátricos. Por un lado, se encuentran los agentes antidiarreicos no específicos, es decir, aquellos que actúan sobre la ocurrencia de diarrea, pero no directamente sobre el agente viral, y pueden ser utilizados en forma general cuando no existe un diagnóstico confirmado. Dentro de éstos, se encuentra una amplia variedad de drogas sintéticas: loperamida, nitazoxanida, racecadotril, crema de bismuto.

En el caso de la loperamida, una droga que actúa sobre el plexo mientérico reduciendo la motilidad intestinal, su uso está contraindicado en niños menores de 12 años debido a la ocurrencia de graves efectos adversos como el íleo paralítico [74]. Por su parte, la nitazoxanida, una droga de la familia de las benzamidas con amplia actividad frente a parásitos helmintos y protozoos intestinales [75], ha sido evaluada para el tratamiento de la diarrea asociada a RVA en numerosos estudios previos [76,77]. Los resultados de las pruebas clínicas en paciente pediátricos hospitalizados por diarrea asociada a RVA, mostraron que la nitazoxanida resulta eficaz para reducir la duración y la severidad de los síntomas [76,77]. Sin embargo, resultaría necesario realizar nuevos y más detallados estudios acerca de los posibles efectos adversos antes de ser recomendada de rutina [63]. El racecadotril constituye una droga antisecretoria que inhibe la acción de la encefalinasa intestinal sin reducir el tránsito intestinal ni promover el sobrecrecimiento bacteriano [78]. El racecadotril presenta actividad frente a RVA, reduciendo el volumen y la frecuencia de las heces y la duración de los síntomas diarreicos [63,79,80]. Sin embargo, resulta fundamental estudiar más detalladamente la seguridad de esta droga así como también la relación costo/efecto previamente a recomendar su uso rutinario en el tratamiento de la diarrea por RVA [81]. Históricamente,

se demostró que el subsalicilato de Bismuto (conocido comercialmente como Crema de Bismuto) resultaba eficaz en el tratamiento de la diarrea secretoria en adultos aunque los resultados obtenidos fueron inferiores en relación a la administración de loperamida [82]. Las pruebas clínicas realizadas en pacientes pediátricos infectados con RVA mostraron que la administración de subsalicilato de Bismuto redujo la duración de la diarrea y la severidad de los síntomas, aunque no logró disminuir la excreción viral [83], probablemente debido a que su acción contra RVA es inespecífica. Finalmente, el uso de antieméticos, como el Ondansetron, no es recomendado en niños afectados por esta patología [84]. La ocurrencia de vómitos constituye una manifestación relativamente frecuente en los casos de gastroenteritis por RVA. En este sentido, el uso de antieméticos puede reducir los síntomas conjuntamente con la necesidad de hospitalización para administración de fluidos intravenosos [73]. Sin embargo, la utilización de Ondansetron ha sido asociada a un aumento en la frecuencia de los episodios diarreicos y a un incremento en el riesgo de sufrir la prolongación del intervalo QT [73], con especial importancia para los pacientes que presentan patologías cardíacas no detectadas.

Por otra parte, el uso de probióticos como complemento a la terapia de rehidratación constituye una estrategia abordada en numerosos estudios previos. Si bien se trata de un enfoque inespecífico, se ha demostrado que la administración oral de diferentes cepas de probióticos disminuye la severidad del cuadro clínico en pacientes pediátricos internados infectados con RVA. En países desarrollados, una dosis oral diaria de 10^9 Unidades Formadoras de Colonias de *Lactobacillus rhamnosus* GG redujo la duración de la diarrea, el riesgo de desarrollar diarrea refractaria y la duración de la internación hospitalaria en niños con gastroenteritis por RVA [85,86]. Pruebas clínicas realizadas en niños de Bolivia hospitalizados por diarrea mostraron que la administración oral de una mezcla de probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Saccharomyces boulardii*) en dos dosis diarias ($1,25 \times 10^9$ células) redujo la duración de la diarrea y el período hospitalario pero no modificó el volumen de la diarrea ni el número de deposiciones por día [77]. Sin embargo, otro ensayo clínico realizado con pacientes pediátricos de la misma institución mostró que la administración de la mezcla de probióticos no logró reducir en forma significativa la duración de los síntomas diarreicos [87], evidenciando la variabilidad en la eficacia del tratamiento. La administración de una única especie de probiótico (*S. boulardii*), en cambio, sí logró la reducción significativa de la duración de la diarrea [87]. La eficacia de la levadura *S. boulardii* en el tratamiento de la diarrea por RVA ya había sido establecida

en estudios previos, en los cuales la administración diaria de dicho probiótico logró reducir en forma significativa la duración de los síntomas y el número diario de deposiciones en pacientes de mayor edad infectados con RVA [88]. Por otro lado, el tratamiento oral con *Lactobacillus paracasei* (cepa ST11) en otra prueba clínica realizada en niños de Bangladesh no modificó significativamente el curso de la infección con RVA, aunque implicó una mejora en diarreas de otras etiologías [89]. En términos generales, la administración oral de algunas especies de probióticos ha demostrado ser una estrategia eficiente en la reducción de la duración de la diarrea y la severidad de los síntomas en pacientes infectados con RVA. En este sentido, podría constituirse como una herramienta complementaria a la terapia de rehidratación oral económica, eficaz y socialmente aceptada dado el uso extendido de probióticos en pacientes sanos [90]. La idea de lograr restaurar la flora intestinal normal y balanceada luego de un episodio diarreico sin la utilización de drogas sintéticas hace que los probióticos sean percibidos como preparaciones seguras y naturales [77]. Sin embargo, la aparición de resultados contradictorios para una misma especie de probiótico y la alta variabilidad en la eficacia de las diferentes especies sugiere que sería necesario realizar un mayor número de pruebas clínicas antes de recomendar el uso rutinario de probióticos en el tratamiento de la diarrea por RVA.

Diversas estrategias han sido abordadas con el objetivo de desarrollar un tratamiento específico para la diarrea asociada a RVA, lo que permitiría actuar no sólo en la mitigación de los síntomas diarreicos sino también sobre el agente causal de la patología. Las estrategias abordadas incluyeron la administración de calostro bovino específico para RVA [91], anticuerpos monoclonales convencionales [92] y anticuerpos IgY policlonales derivados de yema de huevo [93–95]. La administración de calostro bovino permitió reducir significativamente la duración de la diarrea y el riesgo de contagio durante un brote de gastroenteritis asociada a RVA [96]. Por su parte, los anticuerpos IgY obtenidos a partir de yema de huevos de gallinas hiperinmunes contra RVA confirieron protección contra la diarrea inducida por RVA en el modelo de cerdo gnotobiótico [95] así como también la reducción del volumen de heces en niños infectados con RVA y hospitalizados por breves períodos de tiempo [93,97,98]. Sin embargo, si bien algunos de estos tratamientos mostraron eficacia en la reducción de la sintomatología asociada a RVA, ninguno de ellos se encuentra disponible en forma comercial. Esto se debe probablemente a potenciales efectos adversos como la generación de reacciones alérgicas y la contaminación con virus adventicios [98,99]. Los anticuerpos monoclonales,

por su parte, sólo han sido evaluados en el modelo de ratón lactante para la profilaxis frente RVA símico (cepa RRV). Los resultados obtenidos mostraron que la administración de los anticuerpos 30 minutos antes de la inoculación viral protegió contra la infección y la diarrea por RVA [100,101]. No obstante, hasta la actualidad esta estrategia de inmunización pasiva no ha sido implementada como un tratamiento estandarizado para la diarrea por RVA. Aunque los anticuerpos monoclonales presentan una alta especificidad, las dosis requeridas para el tratamiento de pacientes humanos son generalmente elevadas [102] y están asociadas a costos de producción altos. Por otra parte, los anticuerpos tradicionales son susceptibles a la desnaturalización durante su paso por el tracto digestivo, debido a las condiciones de pH ácido del estómago y la degradación por las proteasas gástricas e intestinales en pequeños péptidos que son posteriormente adsorbidos [103].

1.4 HIERBAS AROMÁTICAS UTILIZADAS POPULARMENTE PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIARREA EN ARGENTINA

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, alrededor de tres cuartas partes de la población mundial utiliza remedios tradicionales (principalmente hierbas) para el tratamiento de diversas dolencias [104]. A mediados del siglo XIX, al menos el 80% de las medicinas disponibles eran derivadas de hierbas. Actualmente, se estima que alrededor del 70% de las drogas utilizadas para tratar enfermedades infecciosas son productos naturales o derivados de éstos [105]. La mayoría de estas drogas derivadas de plantas fueron descubiertas a través del estudio de curas tradicionales y conocimientos folclóricos de pueblos originarios y no han podido ser sustituidas a pesar del notable avance de la química sintética [104]. Efectivamente, mediante ensayos de prueba / error milenarios, los pueblos originarios han alcanzado un conocimiento sustancial acerca del uso de plantas medicinales, transmitido de generación en generación como parte de las tradiciones orales de cada pueblo [106]. Los remedios basados en plantas son preparados como infusiones, decocciones, macerados o jarabes, entre otras. Sin embargo, la forma más común de administración son las decocciones [107], que se diferencian de las infusiones en que el agua continúa hirviendo cuando es mezclada con el contenido vegetal.

Las poblaciones originarias de América Central utilizan preparaciones tradicionales de cacao para el tratamiento de la diarrea infantil así como también para otras afecciones intestinales [108]. Diferentes especias y plantas medicinales como el jengibre, el ruibarbo, *Galla chinensis*, el cardamomo, *Moringa oleifera*, *Anthocephalus cadamba* así como también el té verde y el té negro han sido empleados contra la diarrea y se han evidenciado efectos antidiarreicos en estudios previos [109–112]. Los extractos vegetales pueden generar efectos antiespasmódicos, disminuir el tránsito gastrointestinal, suprimir la motilidad intestinal, estimular la adsorción de agua o disminuir la secreción de electrolitos [113]. Asimismo, podrían tener un efecto inhibitorio particular sobre algunos de los microorganismos involucrados en la patogénesis de la diarrea [114].

En Argentina, la medicina folclórica tradicional está focalizada en la atención de problemas digestivos [115,116], dentro de los cuales la diarrea representa una de las afecciones principales. Un estudio realizado en una población campesina criolla en el noroeste argentino arrojó que el 26,5% de las plantas medicinales registradas (alrededor de 90 especies) se empleaba en el tratamiento de afecciones del tracto digestivo [107], lo que se ha verificado también en otras áreas geográficas [117–119]. Es importante destacar que, al menos dentro de la población campesina criolla, no existiría una preferencia entre plantas silvestres o cultivadas cuando éstas son usadas para curar una misma patología [107].

Los productos derivados de hierbas medicinales son utilizados tanto por pacientes adultos como pediátricos, en este último caso administrados por sus progenitores o cuidadores [120]. Si bien la percepción popular es que la eficacia y seguridad de las hierbas medicinales son particularmente elevadas en niños, los estudios que abordan esta problemática son escasos [121]. En términos generales, el uso racional de hierbas medicinales cuidadosamente seleccionadas y preparadas no generaría efectos adversos o toxicidad. Sin embargo, los efectos tóxicos de algunos de estos productos han sido reportados en forma cada vez más frecuente [120]. Se ha comprobado que el uso de preparaciones de consuelda (*Symphytum officinale*) para el tratamiento de la diarrea representa un severo riesgo sanitario, provocando toxicidad hepática en seres humanos (enfermedad veno oclusiva hepática) [113,122]. Los niños podrían ser aún más susceptibles a estos efectos adversos debido a diferencias en la fisiología, sistemas metabólicos enzimáticos inmaduros y la dificultad de establecer correctamente la dosis por peso corporal [120]. En respuesta a la acuciante necesidad de evaluar la seguridad de distintas hierbas medicinales usadas para el tratamiento de la diarrea, se ha realizado un

número limitado de pruebas clínicas. Éstas han indicado que, en términos generales, los efectos adversos por la administración de este tipo de extracto es mínima [113]. Sin embargo, resulta fundamental la evaluación de las distintas hierbas usadas popularmente para descartar la ocurrencia de efectos colaterales sobre la salud humana, especialmente en pacientes pediátricos.

La gastroenteritis asociada a RVA constituye una de las principales causas de diarrea infantil a nivel mundial y también en nuestro país. Existen numerosos productos naturales con actividad contra RVA *in vitro* o en el modelo ratón lactante como el pigmento de cacao, extractos de té, extracto de cáscara de semilla de pino, polisacáridos derivados de *Actinidia chinensis*, extractos de *Artocarpus integrifolia*, *Spondias lutea* y *Stevia rebaudiana* [123–128]. Estudios realizados en un modelo de cerdo privado de calostro infectado con RVA porcino demostraron que la administración oral combinada de extractos de *Sophora flavescens* y *S. rebaudiana* logró mitigar los síntomas diarreicos, y disminuir significativamente las lesiones en el intestino delgado y la excreción viral [129]. Debido a la importancia sanitaria que continúa teniendo la diarrea asociada a RVA en Argentina, resulta entonces de interés estudiar las propiedades antivirales contra RVA de diversas plantas aromáticas usadas en diferentes comunidades campesinas e incluso urbanas para el tratamiento de la diarrea. Por un lado, el estudio de plantas medicinales desde la perspectiva de sus usos populares puede aportar información útil para el descubrimiento de nuevas drogas [130]. Por otra parte, el uso de plantas aromáticas fácilmente cultivables representa una terapia accesible y complementaria a la administración de SRO en pacientes pediátricos, especialmente en zonas rurales. Finalmente, resulta necesario evaluar la seguridad de dichas hierbas para descartar la potencial generación de reacciones adversas durante su uso en niños y adultos.

1.5 ANTICUERPOS MONOCLONALES RECOMBINANTES

1.5.1 Inmunoglobulinas de camélidos

En 1993, Hamers-Casterman y colaboradores [131] descubrieron dos nuevas fracciones de anticuerpos IgG en el suero del camello (*Camelus dromedarius*). Estas moléculas, presentes en todas las especies de camélidos, estaban compuestas de dímeros de cadena pesada y, a diferencia de los anticuerpos héterotetraméricos IgG

convencionales que también poseen los camélidos, no presentaban cadenas livianas y carecen del primer dominio constante de la cadena pesada (CH1) [132] (Fig. 6).

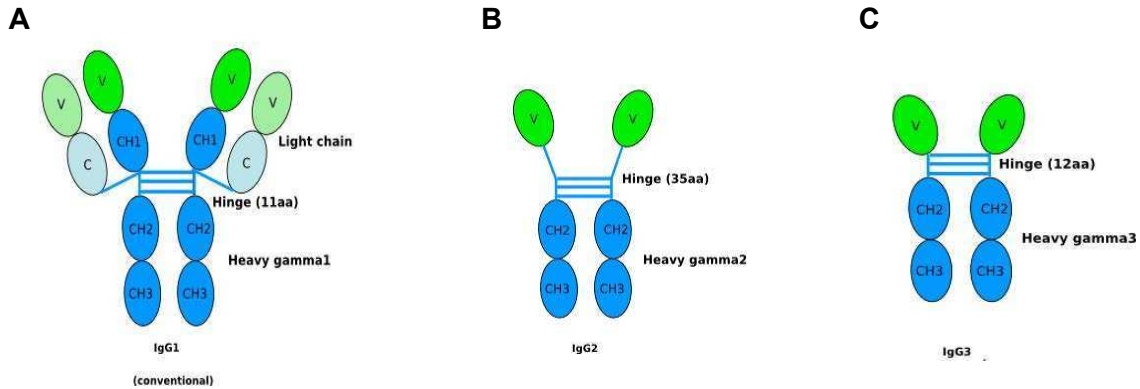


Figura 6. Representación esquemática de las fracciones de anticuerpos del subtipo IgG presentes en los camélidos. A. Anticuerpos convencionales (IgG1) que contienen dos cadenas livianas (dominios V y C) y dos cadenas pesadas (dominios VH, CH1, región bisagra, CH2, CH3). **B-C.** Anticuerpos de cadena pesada homodiméricos IgG2 e IgG3 que contienen únicamente cadenas pesadas, cada una compuesta por un dominio VHH, una región bisagra y dos dominios CH2 y CH3. La región variable N-terminal de los anticuerpos de cadena pesada es una única cadena polipeptídica denominada VHH. Abreviaturas: CH: dominio constante de la inmunoglobulina de cadena pesada; VH: dominio variable de la inmunoglobulina de cadena pesada; C: dominio constante de la inmunoglobulina de cadena liviana; VL: dominio variable de la inmunoglobulina de cadena liviana.

Notablemente, algunas especies de tiburones también presentan inmunoglobulinas que carecen de cadenas livianas y el dominio CH1 convencional [133]. Aunque las secuencias que codifican para las regiones variables de estos anticuerpos (NAR) y los hallados en los camélidos (VHH) son muy diversas, los anticuerpos de ambos grupos muestran una sorprendente convergencia evolutiva en términos estructurales y funcionales [134]. En el caso de los camélidos, los genes que codifican para los anticuerpos de cadena pesada derivan de los genes codificantes de anticuerpos IgG1 tradicionales. Estos genes emergieron y divergieron hace alrededor de 25 millones de años, luego de la separación del suborden *Tylopoda* del resto de los mamíferos (60-80

millones de años aproximadamente) y previamente a la especiación del camello y la llama (alrededor de 11 millones de años) [134]. La aparición de los anticuerpos de cadena pesada fue un evento relativamente reciente en dichas especies.

El porcentaje de anticuerpos IgG tradicionales y de cadena pesada en el suero de los camélidos es variable. En los camellos, los anticuerpos de cadena pesada pueden llegar a alcanzar entre 50-80 % del total mientras que en los camélidos sudamericanos sólo llega a estar entre 10-25 % [135]. Estos porcentajes denotan la importancia de estos anticuerpos en el sistema inmune de los camélidos, que a su vez se dividen en dos subisotipos: IgG2 e IgG3. La principal diferencia entre ambas es la forma y la distancia de la región bisagra (Fig. 6).

1.5.2 Porción variable de anticuerpos de cadena pesada: VHH

La región variable N-terminal de los anticuerpos de cadena pesada se denomina “VHH”, para diferenciarla de la región variable de la cadena pesada de anticuerpos convencionales (VH), y está constituida por una única cadena polipeptídica (Fig. 6). El dominio VHH de los anticuerpos de cadena pesada es el equivalente funcional y estructural del fragmento de unión a antígenos en los anticuerpos convencionales formado por la cadena liviana y los dos primeros dominios de la cadena pesada [132] (Fig. 7). Es decir que constituye el fragmento funcional más pequeño con capacidad de unión antigénica derivado de los anticuerpos de cadena pesada, también conocido como nanoanticuerpo [132].

Las regiones de unión al antígeno de anticuerpos convencionales, pueden producirse mediante ingeniería genética, como fragmentos monovalentes Fab o como un fragmento de cadena simple Fv (scFv), donde la porción de la cadena VH se une a la porción de la cadena VL mediante una secuencia de unión (Fig. 7). Sin embargo, su producción en bacterias o levaduras es dificultosa, especialmente si se desea sintetizar formas multivalentes, donde es necesario unir más de un dominio. Con el descubrimiento de anticuerpos de cadena pesada en los camélidos (cuyo VHH es codificado por un fragmento de gen de 360 pb), la adaptación de la tecnología del ADN recombinante y el desarrollo de estrategias de selección basadas en la técnica de *display* en fagos, que previamente se habían desarrollado para producir scFv, se hizo posible clonar la población de segmentos VHH de una llama inmunizada y a partir de esta biblioteca

inmune de genes VHH, seleccionar aquellos con especificidad para un antígeno determinado. Las bibliotecas inmunes de genes VHH funcionales, poseen mayor diversidad que las de anticuerpos convencionales, en las que la diversidad original se ve disminuida por las combinaciones no funcionales de dominios VH y VL, durante la construcción de la biblioteca. De esta manera, se puede acceder a entidades de unión VHH monoclonales recombinantes específicas originadas en una sola cadena polipeptídica, que poseen ventajas respecto a los scFv [132].

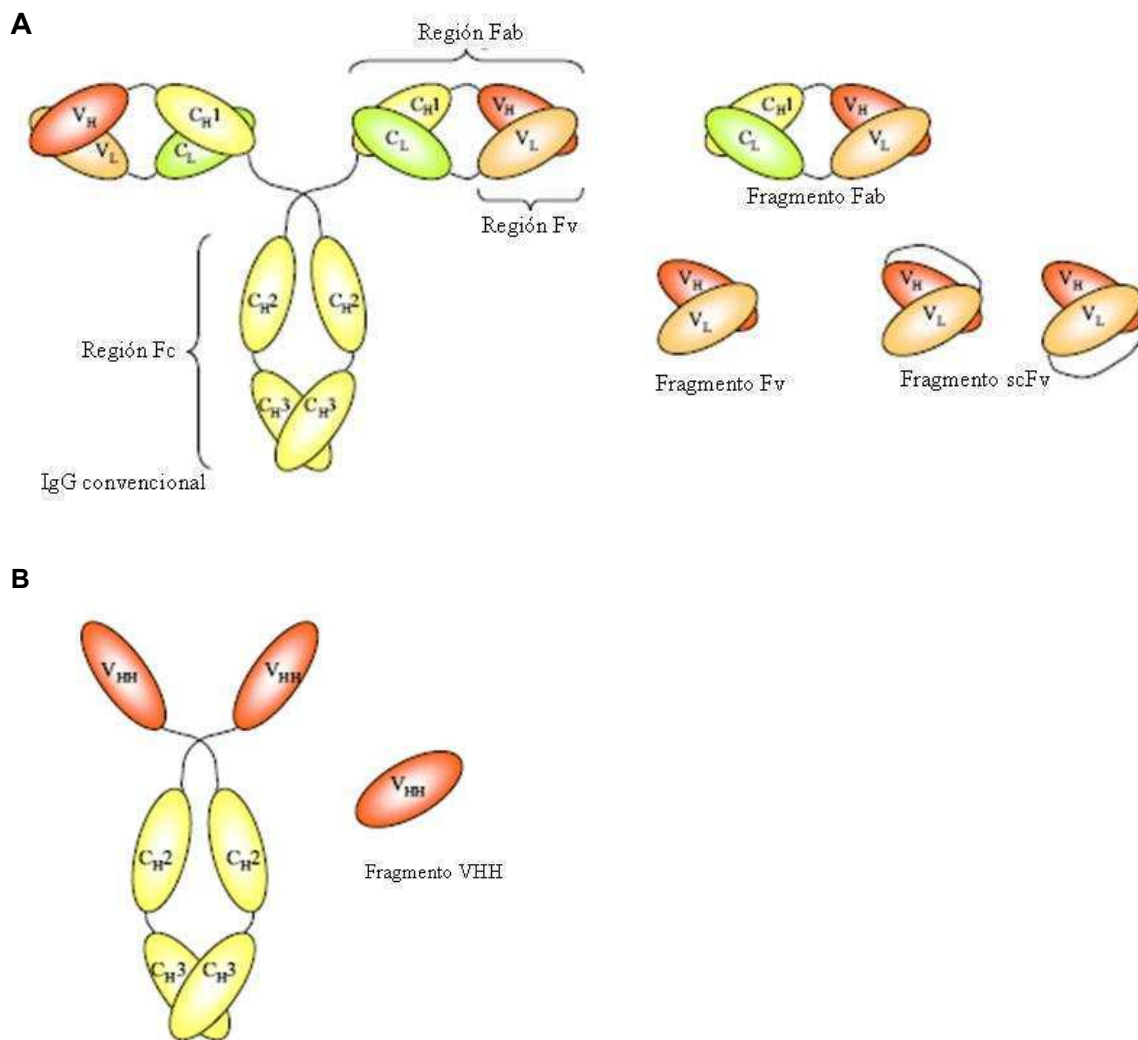


Figura 7. Ilustración esquemática de una IgG convencional y una IgG de cadena pesada y los fragmentos que pueden generarse a partir de los mismos. A. IgG convencional y los fragmentos generados a partir de la misma. Los fragmentos con sitios de unión al antígeno de un Ac convencional son la región Fab ó la región más acotada Fv. Los fragmentos Fab pueden

generarse mediante digestión con papaína. Los Fvs son los fragmentos más pequeños con sitio intacto de unión al antígeno en un anticuerpo convencional, y pueden generarse con digestiones enzimáticas o mediante ingeniería genética como fragmentos recombinantes. En el esquema se muestran las dos posibles configuraciones, en una de ellas el C-terminal del VH se fusiona al N-terminal del VL y en la otra configuración ocurre lo opuesto. **B.** Representación de la estructura de IgG de cadena pesada y los fragmentos generados a partir de la misma. El dominio con sitio de unión al antígeno consiste en la porción variable de la cadena pesada, denominada VHH (*variable heavy-chain fragment of heavy chain antibody*).

Debido a su tamaño reducido (15 kDa) y la forma protuberante del paratope, los VHHs presentan una potente capacidad de unión antigénica y pueden penetrar tejidos e interactuar con nuevos epitopes que resultan inaccesibles para los anticuerpos tradicionales [132,136,137]. Los VHHs son a su vez excepcionalmente resistentes a altas temperaturas [132] y pHs extremos [138,139] y presentan mayor hidrosolubilidad que su contraparte VH de un anticuerpo convencional, lo cual los vuelve excelentes candidatos para el desarrollo de terapias orales. Los VHHs poseen un comportamiento estrictamente monomérico, a diferencia de los scFv que tienden a dimerizar, por lo cual las soluciones de VHH son más homogéneas.

Por otra parte, su pequeño tamaño, su estabilidad, la rápida remoción de sangre periférica y una secuencia codificante que comparte un alto grado de identidad con el dominio VH de las inmunoglobulinas humanas constituyen características que predicen una baja inmunogenicidad en pacientes tratados [132], lo que constituye una característica altamente deseable en una terapia basada en anticuerpos. Efectivamente, ratones y humanos inyectados parenteralmente con construcciones que contenían nanoanticuerpos en ausencia de adyuvantes no generaron una respuesta inmune contra los mismos [140,141]. En relación a la administración oral, no se halló ninguna evidencia de que los nanoanticuerpos translocasen desde el lumen intestinal al torrente sanguíneo [142].

Los VHHs recombinantes pueden producirse eficientemente en diversos sistemas de expresión de proteínas, incluyendo *Escherichia coli* [143], levaduras [144,145], células de insectos y larvas infectados con baculovirus [142,146], probióticos [147,148] y cultivos transgénicos [149]. En *E. coli*, los VHHs pueden expresarse en el espacio periplásmico (ambiente oxidante), donde se forman dos puentes disulfuro característicos de su estructura o canónicos que permiten su correcto plegamiento o en el citosol, en un ambiente reductor.

1.6 NANOANTICUERPOS VHH ANTI-RVA

1.6.1 Desarrollo de VHH anti-VP6

Nuestro grupo de investigación desarrolló previamente 2 clones de nanoanticuerpos recombinantes VHH anti-RVA dirigidos contra la proteína viral VP6 [143]. Para ello, se inmunizó una llama adulta con proteína recombinante VP6 (sobrenadante de cultivos SF9 infectados con un baculovirus recombinante) derivada de la cepa de RVA bovino C486 (G6P[1]I2) y, cuatro días después de la última inmunización, se tomó una muestra de sangre y se extrajeron las células mononucleares mediante gradientes de densidad (Ficoll Paque). Posteriormente, se extrajo el ARN de las células mononucleares obtenidas y se amplificaron los fragmentos VH y VHH mediante RT-PCR. Los fragmentos VHH fueron reamplificados con otra ronda de PCR anidada específica. Para realizar la biblioteca de genes VHH se utilizó el vector pAO, una versión modificada del vector pHEN-4 que contenía un inserto de 1,6 kpb, lo que permitiría favorecer la multiplicación de las bacterias que contuviesen el vector + VHH clonado. Con el objetivo de diferenciar las bacterias transformadas, se incluyó un gen de resistencia a ampicilina [143].

A continuación, se calculó el tamaño de la biblioteca y se procedió al enriquecimiento de la misma en genes de VHH anti-RVA mediante la tecnología de *display* en fagos. Las bacterias de la biblioteca de genes VHH (transformadas con los plásmidos pAO, que contenían las secuencias de los VHH), se infectaron con el fago helper M13 (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.); de esta manera, la progenie de fagos expresaban el repertorio de VHH, como proteínas de fusión con la proteína PIII de su cápside. Para enriquecer la biblioteca en clones específicos, se realizaron tres rondas de biopaneos y luego de cada ronda, los fagos eluidos fueron titulados. En aquellas diluciones de fagos que habían sido capturados con RVA bovino cepa INDIANA, G6P[5]I2, en las cuales se observaban colonias individuales, se seleccionaron 96 clones al azar, sobre los cuales se realizó el ensayo de PCR directamente de las colonias de bacterias. Posteriormente, los amplicones de esa PCR, se digirieron con la enzima HinfI, para estimar la diversidad de los VHH presentes en los fagos eluidos para cada ronda de

selección o biopaneó. Esos 96 clones, fueron analizados luego por un ELISA de fagos para seleccionar aquellos fragmentos VHH específicos para RV y VP6 recombinante.

Aquellos clones que en el ELISA de fagos evidenciaron señal positiva para VP6 y para RVA bovino INDIANA (G6P[5]I2), fueron subclonados en el vector de expresión pHEN6 [150]. El vector pHEN6 es similar a pAO, pero no contiene el inserto de 1,6 kpb, además a través de una secuencia pel B, direcciona la expresión a periplasma de *E. coli* y adiciona 6 Histidinas en el extremo C-terminal. El vector pHEN6 fue amplificado de igual manera que el vector pAO y VHH y vector pHEN6, digeridos con las enzimas de restricción correspondientes, fueron ligados utilizando la enzima T4 ligasa (Promega, Wisconsin, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el producto de ligación se transformaron bacterias XL1-blue químicamente competentes en medios con ampicilina y se realizó la expresión de los VHH en medio suplementado con ampicilina. La purificación se efectuó usando una columna "Hitrap HP chelating column" (GE Healthcare) previamente sensibilizada con 2 ml de Cloruro de Níquel (100 mM). La caracterización final de los VHH se realizó mediante las técnicas de ELISA, *Western Blot* y neutralización viral [143]. A partir de estas pruebas, se seleccionaron dos clones de nanoanticuerpos – 2KD1 y 3B2 – que presentaban amplia actividad neutralizante *in vitro*, frente a cepas de RVA de origen animal y de humanos [143].

1.6.2 2KD1 y 3B2: propiedades y perspectivas

Estudios previos abordaron la capacidad de ambos clones de VHH de proteger frente a la diarrea inducida por RVA *in vivo*. En un primer ensayo, se utilizó el modelo ratón (BALB/c) lactante infectado con RVA murino (cepa) o bovino (cepa C486). Los resultados obtenidos demostraron que ambos clones lograron reducir significativamente la severidad y la duración de la diarrea cuando fueron administrados profilácticamente (2 horas antes de la inoculación viral) [143]. Sin embargo, se registraron algunas diferencias respecto de la acción de ambos clones. Mientras 2KD1 logró reducir la excreción viral en heces hasta niveles indetectables, 3B2 produjo un retraso en el surgimiento del cuadro clínico, reduciendo significativamente la ocurrencia de diarrea, al menos hasta los 4 DPI (tiempo final de la experiencia) [143].

Con el objetivo de lograr un escalado industrial en la producción de los VHH anti-VP6, se decidió adoptar un sistema de expresión en larvas de insecto (*Trichoplusia ni*)

infectadas con baculovirus, que arrojó excelentes rendimientos para ambos nanoanticuerpos [146]. Utilizando los VHH producidos en esta última plataforma, se evaluó la capacidad profiláctica del clon 3B2 en un modelo de cerdo gnotobiótico infectado con la cepa de RVA humano Wa (G1P[8]I8) [142]. El clon 3B2 protegió completamente a los cerdos tratados de la diarrea inducida por RVA, al ser administrado diariamente desde 2 horas antes de la inoculación. En este trabajo se demostró asimismo que el clon 3B2 era capaz de neutralizar un amplio rango de cepas de RVA en ensayos de neutralización viral *in vitro* [142].

Los resultados alcanzados en los trabajos previamente mencionados demostraron la potencialidad de ambos clones de VHH anti-VP6 para la protección frente a distintas cepas de RVA. Sin embargo, los experimentos realizados en el modelo murino utilizaron un rango temporal restringido dado que los ratones lactantes fueron sacrificados a los 4 DPI, lo que dificultó el seguimiento de la infección y el cuadro clínico. Es importante recordar que las cepas de RVA murinas pueden provocar sintomatología hasta los 14 DPI [47]. En este trabajo de tesis, se decidió extender temporalmente los estudios de prevención de RVA murino en el modelo de ratón (BALB/c) para poder evaluar la cinética de la infección viral, la ocurrencia y severidad de los síntomas diarreicos así como también la respuesta inmune frente a RVA y el posible surgimiento de reacciones adversas al tratamiento.

Por otra parte, ninguno de los clones fue evaluado para su administración terapéutica post-infección viral. Recientemente, otro nanoanticuerpo VHH anti-RVA (ARP1) fue utilizado en un ensayo clínico para el tratamiento terapéutico de la diarrea inducida por RVA en pacientes pediátricos de Bangladesh [151]. Si bien ARP1 logró reducir las deposiciones, no disminuyó significativamente la duración de la diarrea ni la excreción viral, contrariamente a lo que se había observado en estudios previos de administración profiláctica en el modelo ratón. Estas discrepancias resaltan la importancia de contar con estudios preclínicos de administración terapéutica de los nanoanticuerpos que permitan predecir el comportamiento y optimizar la administración de esta terapia en pacientes pediátricos. Por estos motivos, el objetivo central de esta tesis fue la evaluación de ambos VHH anti-VP6 para su administración terapéutica post-infección viral, tanto antes como después de la aparición de los primeros síntomas.

Dos preocupaciones fundamentales para cualquier terapia basada en anticuerpos monoclonales son, por un lado, la posibilidad de que los VHH anti-RVA induzcan el desarrollo de una respuesta inmune del hospedador contra estas moléculas. Por otra

parte, resulta prioritario abordar la posibilidad de que el tratamiento genere la aparición de mutantes de escape de RVA por la presión selectiva de los nanoanticuerpos. Ambas posibilidades fueron abordadas en este trabajo en el modelo de ratón BALB/c lactante. Por otra parte, a la hora de evaluar la eficacia de un nuevo tratamiento para una determinada patología resulta prioritario compararlo con las variantes de tratamiento previamente existentes. En este sentido, se efectuó un ensayo comparativo de los VHH anti-VP6 con otras opciones terapéuticas vigentes: nitazoxanida, Crema de Bismuto y hierbas medicinales usadas para el tratamiento de la diarrea y la disentería.

Como ya fuera mencionado previamente, dentro de los posibles sistemas de expresión de proteínas recombinantes a gran escala y bajo costo se encuentran las plantas y animales genéticamente modificados. En el caso de los VHH anti-RVA, ya se han desarrollado plantas de arroz transgénicas modificadas que expresaban el clon ARP1 en lugar de prolamina y glutelina, las principales proteínas de almacenamiento endógenas [149]. En el caso de 2KD1 y 3B2, se planteó el objetivo de desarrollar bovinos transgénicos que expresaran los VHH anti-VP6 en su leche, en colaboración con una empresa biofarmacéutica nacional en el marco del proyecto FONARSEC 03-2010 (Convocatoria Alimentos Funcionales). Para contar con una prueba de principio de la factibilidad de esta tecnología y estudiar su eficacia en un modelo animal, en el presente trabajo de tesis se evaluó la capacidad de ratonas transgénicas que expresan 2KD1+3B2 en leche de proteger a las crías de la diarrea inducida por RVA murino. Este proyecto fue realizado en colaboración con el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, España).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar y optimizar la utilización de dos clones de VHH anti-VP6 -2KD1 y 3B2- para la prevención y el tratamiento de la diarrea asociada a RVA y comparar su eficacia respecto de otras opciones terapéuticas disponibles.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Estandarizar el modelo ratón (BALB/c) lactante de infección con RVA murino.
2. Evaluar la eficacia de dos VHH anti-VP6 -2KD1 y 3B2- para la prevención y el tratamiento terapéutico de la diarrea asociada a RVA en el modelo ratón (BALB/c) lactante infectado con la cepa de RVA murino EcW (G16P[16]I7).
3. Analizar el perfil de respuesta inmune humoral local y sistémica frente a RVA de los ratones tratados con los VHH anti-VP6
4. Evaluar una posible respuesta inmune humoral anti-VHH en los ratones tratados.
5. Evaluar el surgimiento de mutantes de escape de RVA frente al tratamiento con VHH anti-VP6 mediante ensayos *in vivo*.
6. Estudiar el potencial antiviral de dos hierbas aromáticas utilizadas popularmente para el tratamiento de la diarrea y la disentería: *Aloysia citrodora* (cedrón) y *Piper aduncum* (mático).
7. Comparar la eficacia en el tratamiento de la diarrea inducida por RVA de los VHH anti-VP6 y otras opciones terapéuticas: Nitazoxanida, Crema de Bismuto e infusiones de *Aloysia citrodora* y *Piper aduncum*.
8. Evaluar la eficacia y factibilidad de un modelo de ratón transgénico (B57BL/6 x CBA) FI que expresa los VHH anti-VP6 en la leche materna (en colaboración con el INIA, España).

9. Realizar ensayos *in vitro* de resistencia proteolítica, térmica y de liofilización de los nanoanticuerpos VHH con y sin el agregado de diferentes excipientes.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. Los VHH anti-VP6 constituyen una herramienta eficaz para la prevención y el tratamiento terapéutico post-infección de la diarrea inducida por RVA.
2. La administración oral de VHH anti-VP6 no interfiere con el desarrollo de la respuesta inmune humoral contra RVA ni provoca el surgimiento de una respuesta inmune humoral anti-VHH en el hospedador.
3. El tratamiento con anticuerpos monoclonales VHH anti-VP6 no genera el surgimiento de mutantes virales de escape al tratamiento por tratarse de una proteína altamente conservada en las distintas cepas de RVA.
4. Las hierbas aromáticas usadas popularmente para el tratamiento de la diarrea y la disentería en Argentina podrían presentar propiedades anti-RVA.
5. Los anticuerpos VHH anti-VP6 presentan una mayor eficacia en el tratamiento terapéutico de la diarrea por RVA que otras opciones terapéuticas no específicas disponibles (nitazoxanida, crema de bismuto, hierbas medicinales).
6. La expresión de VHH anti-VP6 funcionales en la leche de animales genéticamente modificados constituye una estrategia de prevención anti-RVA eficaz y factible.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 PRODUCCIÓN DE VHH ANTI-VP6

Los dos clones de VHH anti-VP6, 2KD1 y 3B2, fueron obtenidos de una biblioteca genómica construida a partir de la inmunización de una llama con la proteína recombinante VP6 proveniente de la cepa bovina C486 (G6P[1]I2), como fuera precisado previamente. Para esta tesis doctoral, el ADN copia de ambos VHH fue re-clonado utilizando las enzimas de restricción NcoI y NotI en el vector de expresión pHEN6. A continuación, se transformaron bacterias de la cepa *Escherichia coli* XL-1 Blue con los plásmidos construidos. Ambos clones de VHH fueron purificados posteriormente desde el extracto periplásmico de las bacterias empleando una columna con afinidad para secuencia de Histidinas (High-Trap HP Ni-chelating column, GE Healthcare). La pureza de los VHH fue evaluada en un gel de poliacrilamida (12%) teñido con Azul de Coomassie en el cual no se detectó contaminación (Fig. 8). A continuación, ambos VHH fueron resuspendidos en solución fisiológica estéril (NaCl 0,9% p/v, pH 7,3) en una concentración de 3,9 mg/ml para 2KD1 y 7,29 mg/ml para 3B2, de acuerdo a las mediciones realizadas en Nanodrop. Dichas concentraciones resultaron equivalentes a un título de anticuerpos de 32.768 (11,90 ng) para 2KD1 y 65.536 (11,12 ng) para 3B2 mediante un ELISA que determina el título de anticuerpos VHH funcionales, descrito en detalle en la sección 5.4.2. Estos resultados demostraron que ambos VHH fueron expresados no sólo con un alto rendimiento (valor medio de 9,2 mg/L de cultivo) sino también con óptima funcionalidad.

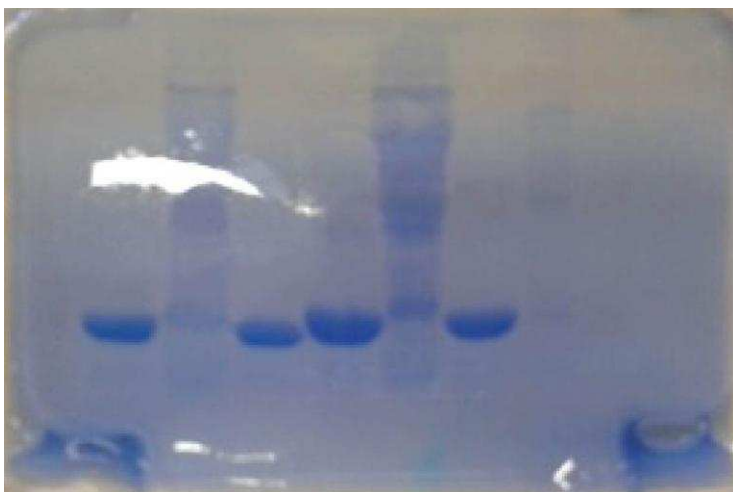


Figura 8. Gel de poliacrilamida teñido con Azul de Coomasie con el perfil electroforético de la producción de VHH. De izquierda a derecha: 2KD1 purificado; 2KD1 Extracto periplásmico; 2KD1 control; 3B2 purificado; 3B2 Extracto periplásmico; 3B2 control. Los controles utilizados provenían de producciones previas de VHH anti-VP6.

4.2 PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA DIARREA INDUCIDA POR RVA MEDIANTE NANOANTICUERPOS VHH ANTI-VP6 EN EL MODELO RATÓN (BALB/C) LACTANTE

4.2.1 Obtención del inóculo viral

La cepa original de RVA murino EcW ((G16P[16]I7) fue amablemente cedida por el Dr. Alejandro Castello (Universidad Nacional de Quilmes), con permiso del Dr. Harry Greenberg (Stanford University, USA). El inóculo viral utilizado en los siguientes ensayos corresponde a un pool de macerados intestinales de 6 ratones lactantes infectados a los 4 días de vida con la cepa original y sacrificados a los 2 días post-inoculación (DPI). Luego de la eutanasia, se removieron los intestinos y congelaron a -70°C . Para el macerado de los intestinos se empleó Solución Salina Balanceada de Hank's (HBSS por sus siglas en inglés): 0,137 M NaCl, 5,4 mM KCl, 0,25 mM Na_2HPO_4 , 0,44 mM KH_2PO_4 , 1,3 mM CaCl_2 , 1,0 mM MgSO_4 , 4,2 mM NaHCO_3 . El macerado se realizó en una proporción del 10% p/v con Hepes (1% v/v) y se descartaron los restos tisulares por centrifugación.

Una vez obtenido el inóculo viral, se realizó una titulación por ELISA y por inmunofluorescencia en cultivo celular (CCIF). Luego, se estableció la Dosis Diarrea 50

(DD₅₀), es decir, el título viral que generaba diarrea en el 50% de los ratones inoculados a los 2 DPI. Para ello, se inocularon 5 camadas de ratones lactantes de cuatro días de vida con diluciones en base 10 del inóculo: 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000. A los 2 DPI, los ratones lactantes fueron evaluados para determinar el porcentaje de ratones con diarrea correspondiente a cada dilución y se calculó la DD₅₀. Para los ensayos experimentales realizados en esta sección, se estableció una dosis de RVA murino (EcW) de 1778 DD₅₀ (~10³ UFF) en un volumen de 100 µl.

4.2.2 Ratones BALB/c y técnicas asociadas

Los ratones BALB/c fueron adquiridos en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata y luego apareados bajo condiciones reguladas para obtener los ratones lactantes. Las hembras preñadas fueron alojadas en jaulas individuales y se les proveyó alimento balanceado y agua *ad libitum*. Todos los protocolos experimentales llevados a cabo en la presente tesis doctoral fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) del Centro de Investigaciones Veterinarias y Agronómicas, INTA bajo los números 10/08, 26/14 y 02/16). En todos los casos, los ratones lactantes fueron inoculados con 1778 DD₅₀ de RVA murino a los 4 días de vida mediante un catéter de teflón flexible en forma intragástrica (Fig. 9) en un volumen de 100 µl, previa administración de 10 µl de NaHCO₃ al 5% p/v. La administración de los nanoanticuerpos VHH también se realizó en forma de una única dosis diaria con un volumen final de 100 µl por esta misma vía. La ocurrencia de diarrea fue evaluada mediante palpación abdominal suave (Fig. 9) y las heces fueron colectadas en forma de pool para cada camada en 80 µl de agua destilada estéril. Los ratones lactantes fueron sacrificados por decapitación manual tras lo cual se obtuvieron las muestras de suero, que también fueron colectadas en forma de pool debido al escaso volumen disponible. En las experiencias para la evaluación de la respuesta inmune, los ratones adultos fueron sacrificados mediante dislocación cervical luego de una sedación inhalatoria leve con isoflurano. En este caso, las muestras de suero fueron obtenidas por punción cardíaca de los animales previamente sedados. A lo largo de las distintas experiencias, se realizaron todos los esfuerzos pertinentes para reducir el stress y el sufrimiento de los animales.



Figura 9. Ratones BALB/c utilizados en los experimentos y técnicas asociadas. De izquierda a derecha: ratones BALB/c adultos; ratones BALB/c lactantes; técnica de administración intragástrica; evaluación de la ocurrencia de diarrea por palpación abdominal.

4.2.3 Ensayos profilácticos

El potencial profiláctico de los nanoanticuerpos VHH anti-RVA en el modelo ratón lactante fue abordado en estudios previos, tanto en el caso de 2KD1 y 3B2 [143,146] como para otros nanoanticuerpos desarrollados para el tratamiento de la diarrea asociada a RVA (ARP1, ARP3) [145,147,152]. Sin embargo, en todos los casos los animales fueron sacrificados a los 4 DPI y la infección intestinal por RVA sólo fue evaluada en ese tiempo. En esta tesis doctoral, se modificaron los esquemas previos con el objetivo de poder analizar la evolución de la infección por RVA en el tejido intestinal y monitorear el desarrollo de la enfermedad por un período de tiempo más prolongado. Para los estudios de profilaxis, los ratones fueron sacrificados en forma secuencial desde 0 DPI hasta la eutanasia final a los 7 DPI, lo que permitió obtener muestras de tejido intestinal para cada día (Fig. 10A).

En este ensayo se utilizaron dos grupos de ratones compuestos por 4 madres y sus respectivas camadas y se evaluaron dos dosis conjuntas de 2KD1+3B2 en solución fisiológica estéril comercial (pH=6.5) con un volumen final de 100 µl: 2KD1+3B2 (160 µg, 80 µg de cada clon) y 2KD1+3B2 (200 µg, 100 µg de cada clon). Ambos tratamientos fueron administrados como una única dosis diaria comenzando a los -1 DPI hasta los 7 DPI. A los 0 DPI, se realizó la inoculación viral con 1778 DD₅₀ de RVA murino EcW dos horas después de la administración del tratamiento (Fig. 10A). Para ambas dosis, se utilizó una mezcla equivalente de ambos clones con el objetivo de minimizar la posible

aparición de mutantes virales de escape al tratamiento mediante la administración de dos anticuerpos monoclonales dirigidos a distintos epítopes. Los ratones fueron monitoreados diariamente para evaluar la ocurrencia de diarrea, coleccionar muestras de heces (en forma de pool por camada) y realizar eutanasias secuenciales. Cada día, se sacrificó un total de 4 ratones por tratamiento para obtener el contenido intestinal de los mismos y evaluar la infección viral. A los 7 DPI, se sacrificaron los últimos ratones de cada tratamiento y se procesaron las muestras obtenidas.

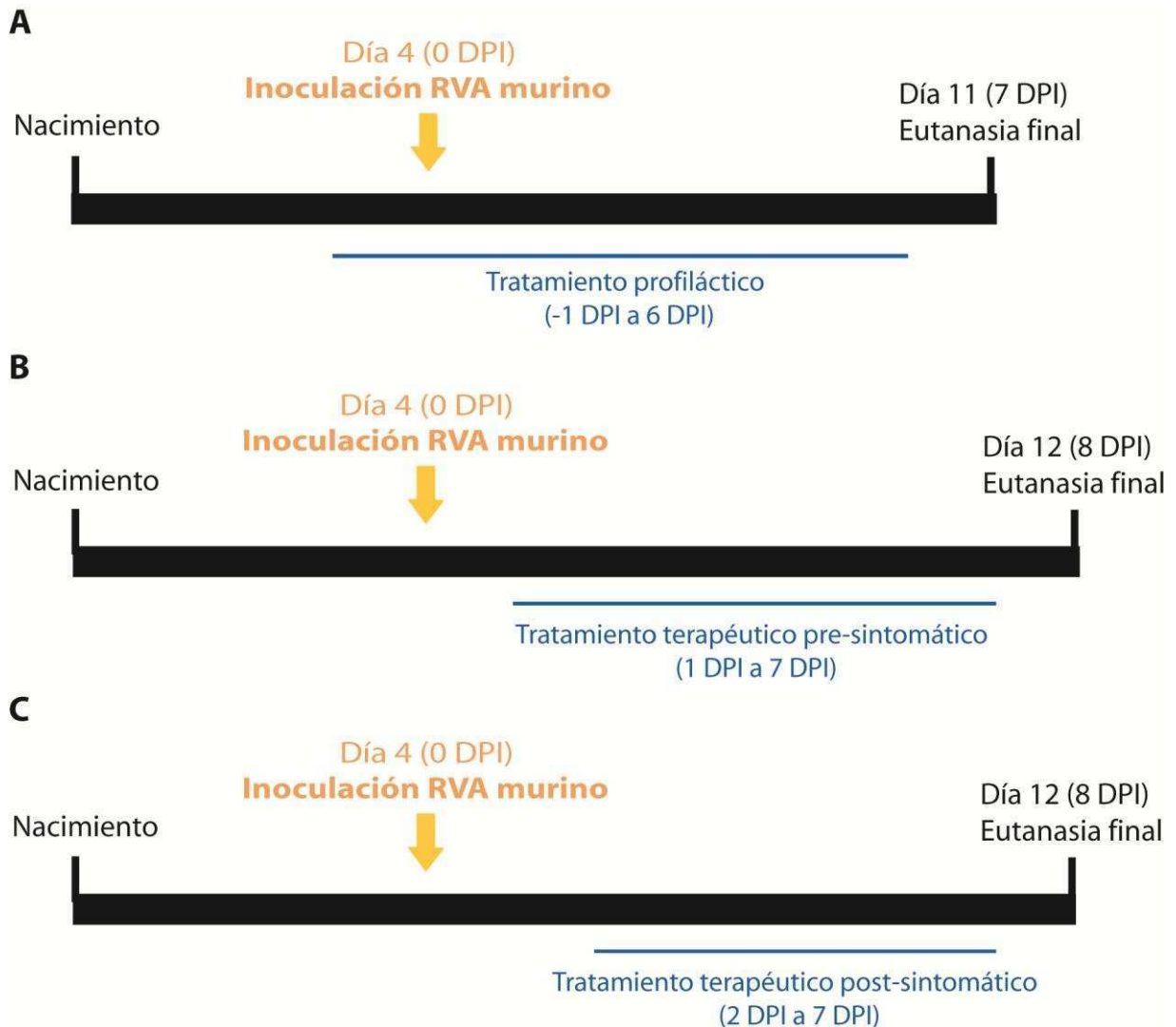


Figura 10. Esquema de inoculación viral, tratamiento y eutanasia utilizados en los ensayos experimentales realizados en el modelo ratón BALB/c lactante.

A. Tratamiento profiláctico. **B.** Tratamiento terapéutico pre-sintomático. **C.** Tratamiento terapéutico post-sintomático.

4.2.4 Ensayos terapéuticos pre-sintomáticos

Como ya fue mencionado previamente, nuestro grupo de trabajo evaluó en trabajos anteriores la utilización por separado de 2KD1 y 3B2 en la profilaxis de la diarrea por RVA en el modelo ratón lactante [143] y el uso de 3B2 para la prevención de la diarrea por RVA humano en el modelo de cerdo gnotobiótico [142]. Sin embargo, la utilización de estos clones para el tratamiento terapéutico post-inoculación viral de la diarrea inducida por RVA no había sido abordada hasta ahora. Estudios previos sobre el tratamiento terapéutico de la diarrea inducida por RVA mediante diferentes terapias comenzaron la administración del tratamiento entre 2 y 24 horas post-inoculación [148,149,153]. En nuestro caso, decidimos comenzar la administración de los nanoanticuerpos a las 24 horas post-inoculación (1 DPI) para asegurar que se hubiese completado un ciclo de replicación viral *in vivo* antes de la primera dosis de tratamiento (Fig. 10B). Asimismo, este esquema impediría la posible neutralización del inóculo viral antes de que éste pudiera establecer una infección exitosa en el tejido intestinal.

En primer lugar, se realizó un ensayo piloto de dosis/respuesta en el que se evaluó la capacidad de tres dosis de 2KD1+3B2 – 100 µg, 160 µg y 200 µg – de reducir o mitigar la ocurrencia de diarrea en los ratones lactantes infectados con 1778 DD₅₀ de RVA murino EcW (G16P[16]I7). Debido a que la dosis de 100 µg de 2KD1+3B2 (50 µg cada uno) no logró modificar el curso de la diarrea respecto del control no tratado (Fig. 11), esta dosis fue descartada de los experimentos subsiguientes.

Para evaluar la eficacia de los nanoanticuerpos en el tratamiento terapéutico pre-sintomático de RVA, los ratones fueron inoculados con 1778 DD₅₀ de RVA murino EcW al cuarto día de vida y 24 horas más tarde (1 DPI) recibieron la primera dosis de los nanoanticuerpos VHH (Fig. 10B). En esta experiencia se utilizaron 4 grupos, cada uno conformado por 4 madres y sus respectivas camadas: 160 µg de 2KD1+3B2 (80 µg c/u), 200 µg de 2KD1+3B2 (100 µg c/u), 2KD1 200 µg y 3B2 200 µg. El tratamiento continuó en forma de una dosis diaria hasta los 7 DPI. Asimismo, se incluyeron los siguientes controles: ratones inoculados y no tratados, ratones no inoculados. Los ratones de todos los grupos fueron evaluados diariamente y sacrificados en forma secuencial tomándose las muestras biológicas correspondientes como ya fue descrito para el ensayo profiláctico. A los 8 DPI, se realizó la eutanasia final a partir de lo cual comenzó el procesamiento de las muestras.

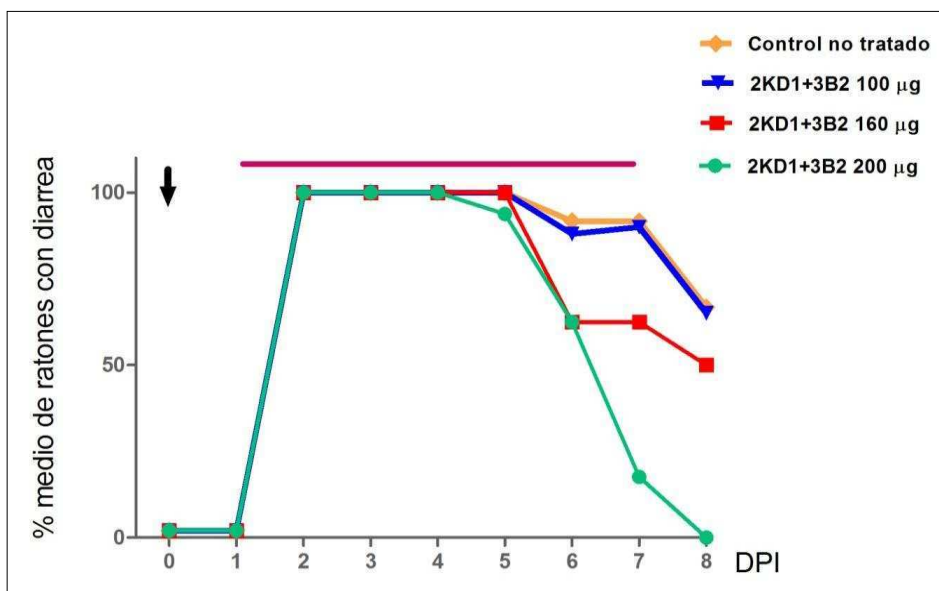


Figura 11. Ensayo piloto dosis/respuesta de tratamiento terapéutico pre-sintomático mediante nanoanticuerpos VHH anti-VP6. Se evaluaron 3 dosis (100 µg, 160 µg, 200 µg) de los nanoanticuerpos 2KD1 y 3B2 en forma combinada y se determinó la evolución del cuadro de diarrea en relación al control inoculado no tratado. La flecha indica el momento de la inoculación con 1778 DD₅₀ de RVA murino (0 DPI) y la línea púrpura muestra la duración del tratamiento con nanoanticuerpos VHH. A partir de los resultados obtenidos, se excluye la dosis de 100 µg de los ensayos posteriores.

4.2.5 Ensayos terapéuticos post-sintomáticos

Los resultados obtenidos en el ensayo piloto dosis/respuesta demostraron que los ratones inoculados con 1778 DD₅₀ de RVA murino desarrollan síntomas de diarrea a partir de los 2 DPI (Fig. 11). Si los nanoanticuerpos VHH fueran utilizados para el tratamiento de pacientes pediátricos con diarrea asociada a RVA, la administración del tratamiento comenzaría inevitablemente luego de la manifestación de los primeros síntomas diarreico. Con el objetivo de determinar si el tratamiento terapéutico post-sintomático (a partir de los 2 DPI en este modelo animal) con los nanoanticuerpos VHH tendría una eficacia similar a la obtenida en el caso del tratamiento terapéutico pre-sintomático (comenzando 1 DPI) utilizamos un nuevo grupo de ratones, compuesto por 4 madres y sus crías. En este caso, los ratones lactantes fueron inoculados con la misma dosis viral (0 DPI) y recibieron un tratamiento de 200 µg de 2KD1 a partir de los 2 DPI, cuando todos los ratones del grupo ya habían presentado síntomas de diarrea (Fig. 10C). El tratamiento se mantuvo hasta los

7 DPI y la experiencia siguió el protocolo ya descrito previamente. Se incluyeron asimismo los controles correspondientes: ratones inoculados no tratados y ratones no inoculados.

4.2.6 Detección de partículas virales infecciosas en contenido intestinal

En todos los casos, los animales fueron diseccionados posteriormente a la eutanasia y se obtuvieron los intestinos que fueron almacenados a -70°C . A continuación, se los descongeló y fueron macerados en HBSS como ya fuera descrito. Los macerados intestinales fueron evaluados para la detección de partículas infecciosas de RVA murino mediante la técnica de CCIF, como ya fuera descrito en trabajos previos para muestras de origen bovino [154]. Brevemente, las muestras fueron diluidas en MEM-D (Invitrogen) suplementado con tripsina (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania) $2\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y gentamicina (2%) en diluciones seriadas en base 10. A continuación fueron inoculadas sobre monocapas de células MA-104 ($100\ \mu\text{l}/\text{pocillo}$). Luego de 36-48 horas de incubación a 37°C y 5% CO_2 , se descartó el sobrenadante y las monocapas infectadas fueron fijadas con acetona al 70% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células infectadas fueron reveladas con una dilución 1/100 de un anticuerpo IgG bovino anti-RVA marcado con FITC y con una dilución 1/500 de nanoanticuerpos 2KD1 marcado con Alexa Flúor® 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.) en Azul de Evans durante una hora a 37°C y CO_2 5%. Debido a que la mayor parte de las muestras de este trabajo son de origen murino, utilizamos los nanoanticuerpos marcados con Alexa Flúor® 488 para corroborar los resultados obtenidos por el anticuerpo bovino. El hecho de que los VHH reconocieran al virus excretado también fue una forma de confirmar que no se trataba de virus mutantes de escape al tratamiento. Las células fluorescentes fueron contadas utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus) (Fig. 12) y el título de RVA infeccioso se expresó como Unidades Formadora de Focos (FFU) por ml:

UFF/ml = inversa de la máxima dilución con células infectadas/volumen del inóculo

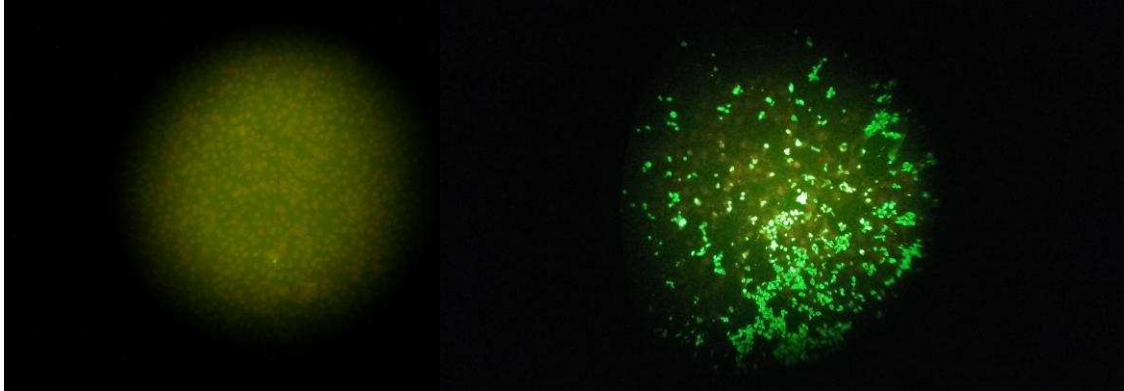


Figura 12. Detección de partículas virales infecciosas en muestras de contenido intestinal de ratones BALB/c. A la derecha se observa una muestra negativa para RVA. A la izquierda una muestra positiva para RVA con el citoplasma de las células infectadas teñido por el anticuerpo marcado con Alexa Flúor® 488.

4.2.7 Determinación de la excreción viral en materia fecal

Se evaluó la excreción viral en heces mediante un ELISA doble captura ya descrito previamente [155,156]. En este ensayo, se sensibilizaron placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 100 μ l de una dilución 1/7.000 de suero hiperinmune anti RVA obtenido en cobayos (captura positiva) o suero normal de cobayo (captura negativa) 1/7.000 en buffer carbonato-bicarbonato (pH 9.6) durante 1 hora a 37°C CO₂ 5%. Luego de 3 lavados con el buffer de lavado (PBS-Tween₂₀ 0.05%, pH: 7.4), se adicionaron sobre cada captura, diluciones seriadas en base 10 de las muestras a analizar (heces, contenidos intestinales, sueros o suspensiones virales de cultivo). Como controles positivos y negativos se utilizaron materias fecales o contenidos intestinales de ratones inoculados no tratados de ensayos previos. El buffer de lavado fue utilizado como blanco de reacción. A continuación, se agregó una dilución 1/5.000 de suero hiperinmune bovino anti RVA, seguido de una dilución 1/4.000 de anticuerpo conjugado comercial anti bovino marcado con peroxidasa (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, EE.UU.). Las placas fueron reveladas con H₂O₂-ABTS [2-2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonato)] como sistema sustrato/cromógeno. La reacción fue detenida por el agregado de 50 μ l/pocillo de SDS (dodecilsulfato sódico) al 5%. La absorbancia fue leída a 405 nm (A₄₀₅ nm) (lector de ELISA, Multiskan Ex, Lab Systems). Se consideraron positivas aquellas muestras cuya absorbancia corregida fuera mayor a la

media aritmética de la absorbancia en la captura positiva de los pocillos blanco (2 réplicas con PBS) más 3 desvíos estándar.

4.2.8 Respuesta inmune humoral anti-RVA

Con el objetivo de evaluar si el tratamiento con los VHH anti-VP6 -en los 3 esquemas de administración- alteraba la respuesta inmune contra RVA del hospedador, se analizaron muestras de suero y contenido intestinal a los 0, 7 y 40 DPI de todos los grupos tratados y el control no tratado. Debido al escaso volumen de las muestras, en particular para aquellas colectadas a los 0 y 7 DPI, se decidió evaluar únicamente el isotipo de anticuerpos predominante en cada tipo de tejido. Las muestras correspondientes a los 0 y 7 DPI fueron obtenidas de los experimentos ya descriptos previamente. Para obtener muestras de suero y contenido intestinal a los 40 DPI se realizó un experimento adicional. Se utilizaron 8 grupos de ratones lactantes (con una media de 5 ratones por grupo), asignándose un tratamiento a cada grupo: tratamiento profiláctico 160 µg de 2KD1+3B2 (80 µg c/u); tratamiento profiláctico 200 µg de 2KD1+3B2 (100 µg c/u); tratamiento terapéutico pre-sintomático 160 µg de 2KD1+3B2 (80 µg c/u); tratamiento terapéutico pre-sintomático 200 µg de 2KD1+3B2 (100 µg c/u); tratamiento terapéutico pre-sintomático 200 µg de 2KD1; tratamiento terapéutico pre-sintomático 200 µg de 3B2; tratamiento terapéutico post-sintomático 200 µg de 2KD1; control inoculado no tratado. A los 40 DPI, se sacrificó a los animales y se obtuvieron muestras de suero y contenido intestinal como ya fuera descripto. Las muestras de suero fueron evaluadas para detectar anticuerpos IgG anti-RVA mientras que las muestras de intestino fueron usadas para detectar anticuerpos IgA anti-RVA, mediante un ELISA indirecto basado en protocolos previamente publicados para bovinos [156–158] con varias modificaciones.

En primer lugar, se sensibilizaron placas (Maxisorp, NUNC) de 96 pocillos un suero porcino hiperinmune contra RVA (1/5.000) y se realizó un bloqueo con leche descremada comercial (Sancor, Sunchales, Argentina) al 10% p/v en PBS-tween 0,5%. A continuación, se colocó sobrenadante clarificado de cultivos de MA-104 infectados con RVA murino adaptado a cultivo (título de 10^3 por ELISA, pocillos positivos) o sobrenadante de células MA-104 sin infectar (pocillos negativos), ambos en una concentración de 1/2 en PBS-tween 0,5%. Las muestras de suero o contenido intestinal fueron sembradas en diluciones seriadas base 4 comenzando en una dilución 1/4. En el caso de las muestras

de suero, se agregó a continuación un anticuerpo comercial de cabra anti-IgG murino conjugado con Peroxidasa (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) en una dilución 1/3.000 mientras que para las muestras de intestinos, se usó un anticuerpo comercial de cabra anti-IgA murino conjugado con Peroxidasa (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) también en una dilución 1/3.000. Luego de última incubación a 37°C, se revelaron y leyeron las placas como se detalló en los ELISA previos. El título de anticuerpos IgG e IgA anti-RVA en cada muestra se expresó como la inversa de la mayor dilución cuya absorbancia corregida ($A_{405c} = A_{405}$ en pocillos positivos - A_{405} en pocillos negativos) superara el punto de corte del ensayo. Para el punto de corte se consideró que la absorbancia a 405 nm corregida de cada muestra superara el valor del promedio de las absorbancia obtenida en los pocillos de captura positiva del blanco de reacción más 3 desvíos estándar. Como controles positivos se utilizaron muestras de suero e intestino de ratones hiperinmunizados con RVA murino (cepa EcW) y como control negativo se utilizaron muestras de ratones inmunizados con solución fisiológica estéril.

4.2.9 Estudio de la respuesta inmune humoral anti-VHH del hospedador

Se analizó el posible desarrollo de una respuesta inmune humoral de los ratones lactantes tratados oralmente frente a los nanoanticuerpos VHH 2KD1 y 3B2. En primer lugar, se estudió la posible translocación de los nanoanticuerpos a sangre periférica desde el tejido intestinal, mediante el ELISA de detección de VHH descrito en la sección 5.4.2, en muestras de suero de ratones tratados durante todo el período de administración oral de los nanoanticuerpos. Por otra parte, se analizaron muestras de suero para la detección de anticuerpos IgG anti-VHH y muestras de contenido intestinal para la detección de anticuerpos IgA anti-VHH de todos los grupos tratados a los 0, 7 y 40 DPI mediante un ELISA específico. Para este ensayo, las placas (Maxisorp, NUNC) de 96 pocillos fueron sensibilizadas con 50 ng por pocillo de 2KD1 o 3B2 (de acuerdo al tratamiento recibido por los ratones lactantes) en buffer carbonato-bicarbonato pH: 9.6 y bloqueadas posteriormente con leche descremada (Sancor, Argentina). Las muestras de suero o contenido intestinal fueron colocadas en diluciones seriadas en base 4, comenzando con una dilución inicial 1/4. Luego se incubaron las placas con un anticuerpo comercial de cabra anti-IgG murino conjugado con Peroxidasa (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) en el caso de las muestras de suero y con un anticuerpo comercial de

cabra anti-IgA murino conjugado con Peroxidasa (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) para las muestras de contenido intestinal, ambos en una dilución 1/3.000. El revelado de las placas y la determinación del punto de corte del ensayo se realizaron con ABTS/agua oxigenada como ya fuera descrito. Esta técnica fue estandarizada utilizando como controles positivos muestras séricas e intestinales de los ratones inmunizados con 2KD1/3B2 en presencia de adyuvantes provenientes del ensayo de inmunogenicidad de los nanoanticuerpos VHH *in vivo* descrito a continuación. A modo de controles negativos se usaron muestras de ratones no inmunizados con RVA.

Para evaluar la inmunogenicidad del tratamiento si éste fuera administrado por vía sistémica, se realizó un ensayo de inmunización de ratones adultos que no habían sido sometidos previamente a la administración oral de VHH. Se utilizaron 16 ratones adultos de 2 meses de vida separados en 4 grupos. En todos los casos, los ratones fueron inmunizados con 2 dosis de 50 ng de VHH por vía subcutánea. La segunda dosis fue aplicada 21 días después de la primera. Los grupos, cada uno compuesto por 4 ratones adultos, recibieron los siguientes tratamientos en ambas oportunidades: 50 ng de 2KD1 + adyuvantes; 50 ng de 2KD1 sin adyuvantes; 50 ng de 3B2 + adyuvantes; 50 ng de 3B2 sin adyuvantes. En relación a los adyuvantes utilizados, se empleó adyuvante completo de Freund en la primera inoculación y adyuvante incompleto de Freund en el caso de la segunda. Se obtuvieron muestras de suero a los 0, 30 y 60 DPI. En los primeros dos casos, se obtuvieron muestras por punción de la vena caudal. A los 60 DPI, los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de suero por punción cardíaca y muestras de contenido intestinal *post-mortem*. Las muestras de suero fueron analizadas para detectar la presencia de anticuerpos IgG anti-VHH mientras que las muestras de contenido intestinal fueron evaluadas para anticuerpos IgA anti-VHH.

4.2.10 Surgimiento de mutantes de RVA de escape al tratamiento *in vivo*

Con el objetivo de analizar si la administración de nanoanticuerpos VHH podría generar el surgimiento de mutantes virales de escape al tratamiento, se analizaron muestras de macerado intestinal y heces seleccionadas previamente. El criterio utilizado fue:

- Que las muestras fueran positivas para RVA, luego de 4-6 días de tratamiento con nanoanticuerpos VHH

- Que las muestras fuesen positivas para RVA cuando las muestras previas en ese grupo eran negativas para RVA por al menos dos días previos.

El propósito de los criterios usados fue evaluar si estos picos de excreción viral observados en algunos grupos obedecían al surgimiento de mutantes de escape generados luego de una presión selectiva del tratamiento durante algunos días o podían deberse a otros motivos. Se utilizaron muestras del inóculo viral y grupos inoculados no tratados a modo de controles.

En primer lugar, se extrajo el ARN viral utilizando el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante y empleando un volumen inicial de 200 μ l de macerados intestinales/materia fecal previamente centrifugados. El ARN recuperado fue eluido en 40 μ l de buffer de elución y almacenado a -80°C hasta su utilización. A continuación se amplificó en gen completo que codifica para la proteína VP6 (1356 pb) mediante una RT-PCR utilizando el kit One Step RT-PCR (Qiagen) que realiza la retrotranscripción del RNA y la amplificación del gen en una misma reacción, siguiendo el protocolo del fabricante. En primer lugar, se efectuó la desnaturalización del ARN mediante la incubación de 5 μ l de cada muestra a 95°C por 5 minutos y posteriormente los tubos fueron colocados en hielo hasta su utilización. Por otra parte, se realizó la mezcla para la RT-PCR compuesta por Buffer PCR 5X 12,5 MgCl_2 (Qiagen), 10 μM de los 4 dNTPs, 10 μM de cada primer usado y 1 U de Enzyme Mix OneStep (Qiagen) en un volumen final de 25 μ l. En un comienzo, se utilizaron los *primers* VP6 gral (Fw y Rv) que amplifican todo el gen de VP6. En una segunda instancia, se realizaron dos reacciones para la amplificación de los extremos del gen, usando los *primers* ya mencionados en conjunto con otros dos *primers* internos (Tabla 1).

La RT-PCR se llevó a cabo mediante el siguiente programa:

- 50°C durante 30 minutos
 - 95°C por 15 minutos
 - 94°C por 1 minuto
 - 43°C por 2 minutos
 - 72°C por 3 minutos
 - 72°C por 10 minutos
- } **35 ciclos**

Los productos del gen completo (1356 pb) y de los extremos inicial (280 pb) y final (555 pb) fueron revelados en geles de agarosa al 2% teñidos con SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) y finalmente visualizados bajo luz UV.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Localización (VP6 RVA)	Tamaño del amplicón (pares de bases)
VP6 Fw Gral.	GGCTTTATAAACGAAGTCTTC	1-28	1356 pb
VP6 Rv Gral.	GGTCACATCCTCTCACT	1340-1356	
VP6 fin Fw	GAAGTTGAATTTCTTTAAATGGTC	801-825	555 pb
VP6 inicio Rv	CCATTCATCCATGCATACG	280-265	280 pb

Tabla 1. *Primers* utilizados para la amplificación del gen que codifica para la proteína VP6 de RVA murino.

A continuación, los fragmentos fueron purificados usando el kit ExoSAP-IT (Affymetrix Inc., Santa Clara, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras purificadas fueron secuenciadas en ambos sentidos utilizando un secuenciador automático (ABI Prism 377, Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.) perteneciente al servicio de secuenciación del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar. La secuenciación fue realizada utilizando los oligonucleótidos usados en las reacciones de PCR. Las secuencias obtenidas fueron editadas usando BioEdit 7.0.9.0 [159]. Las comparaciones entre las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se realizó mediante el programa MEGA5 [160]. Finalmente, se construyó un árbol filogenético utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de 3 parámetros de Tamura usando como método de soporte estadístico un Bootstrap con 1000 repeticiones. Las secuencias de referencia de RVA fueron obtenidas del GenBank.

4.3 PREVENCIÓN DE LA DIARREA INDUCIDA POR RVA EN UN MODELO DE RATONAS TRANSGÉNICAS (B57BL/6 X CBA) FI QUE EXPRESAN 2KD1+3B2 EN LECHE MATERNA

4.3.1 Desarrollo y caracterización de ratonas transgénicas que expresan VHH anti-VP6 en leche

El objetivo principal de este ensayo fue evaluar la prevención de RVA en un modelo de administración continua de los VHHs en el contexto de la leche. Para ello, en colaboración con el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA, Madrid, España), se generaron ratones transgénicos (B57BL/6 x CBA)FI (Fig. 13) mediante una inyección pronuclear con una construcción que incluía los genes de expresión de 2KD1 y 3B2 bajo la regulación de un promotor de MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus). El MMTV es un retrovirus murino que se transmite a través de la leche materna, por lo que fue seleccionado para garantizar la expresión de los nanoanticuerpos en la leche de las ratonas transgénicas. La expresión exitosa de los nanoanticuerpos en la leche fue verificada mediante el ELISA para la detección de VHH funcionales y el ensayo de reducción de focos fluorescentes de RVA previamente descritos en muestras de leche obtenidas mediante ordeño con un dispositivo mecánico en el INIA. Dos horas antes del ordeño, los lactantes eran separados de su madre, a la cual se administraban 0,1 ml de oxitocina (2 UI) por vía intraperitoneal. Todas las hembras utilizadas fueron examinadas para descartar la presencia de anticuerpos anti-RVA que pudieran interferir en los ensayos de protección de las crías.

4.3.2 Protección frente a RVA de ratones lactantes amamantados por madres transgénicas

En todos los casos, los ratones se hallaban alojados en el bioterio del *Centre de Reserca en Sanitat Animal* en Barcelona, por lo que el ensayo se efectuó en dichas instalaciones basándose en protocolos estandarizados para ratones transgénicos que expresan otras moléculas en leche materna (122). Los ratones *wild type* usados correspondían a la cepa CBA. En este primer ensayo, los ratones fueron inoculados entre los 4 y los 7 días de vida con 178 DD₅₀ de RVA murino (cepa ECw) mediante catéter

intragástrico como ya fuera detallado. En este caso, se decidió utilizar una dosis viral diez veces menor que en los ensayos previos pero que continuaba provocando diarrea en el 100% de los ratones inoculados no tratados. Con el objetivo de determinar si la administración continua de 2KD1+3B2 en la leche lograba prevenir o mitigar la diarrea por RVA, se utilizaron 2 grupos de ratones, cada uno compuesto por 3 madres y sus respectivas camadas: Madre transgénica con crías transgénicas (TR/tr); madre *wild type* con crías *wild type* (WT/wt). Este último grupo funcionó como equivalente al control inoculado no tratado. La experiencia continuó como ya fuera descrito para los experimentos realizados con ratones BALB/c. Los ratones fueron evaluados diariamente para establecer la ocurrencia de diarrea y, en esta experiencia, se asignó un *score* de materia fecal: 0 sin diarrea, 1 diarrea leve y 2 diarrea severa. Se consideró como diarrea leve una pérdida moderada de consistencia de las heces, con coloración normal o amarillenta. Se consideró diarrea severa a heces líquidas amarillas con presencia de mucus. Además de las muestras de heces, suero e intestino en este ensayo se obtuvieron muestras de estómago de los ratones amamantados por ratonas transgénicas para detectar los nanoanticuerpos VHH ingeridos con la leche materna.

4.3.3 Experimento de *cross-fostering*

A continuación, para estudiar si la transgénesis en sí generaba un efecto sobre la protección frente a RVA, se inocularon otros 2 grupos (cada uno compuesto por 3 madres y sus camadas), realizando previamente *cross-fostering* de las crías: Madre Transgénica con crías *wild type* (TR/wt); Madre *wild type* con crías transgénicas (WT/tr). El *cross-fostering* se realizó dentro de los dos primeros días de vida de los ratones, al menos 4 días antes de la inoculación. Se incluyó asimismo un grupo control no inoculado. La experiencia continuó como ya fuera descrito en la sección anterior.



Figura 13. Ratones B57Bl/6, CBA e híbridos utilizados en los experimentos y técnicas asociadas. De izquierda a derecha: ratón lactante *wild type* (CBA); ratones lactantes transgénicos (B57BL/6 x CBA)FI; técnica de administración intragástrica; evaluación de la ocurrencia de diarrea por palpación abdominal.

4.4 CARACTERIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE ANTICUERPOS VHH ANTI VP6

4.4.1 Actividad neutralizante contra RVA

Con el objetivo de abordar la capacidad neutralizante de ambos clones de VHH, se realizaron ensayos de reducción de focos fluorescentes para la detección de anticuerpos neutralizantes anti-RVA, utilizando distintas cepas de RVA. En el caso de 3B2, su potencial neutralizante frente a cepas de RVA de origen humano y animal ya había sido abordado en trabajos previos [142]. Por este motivo, los ensayos realizados en este trabajo se centraron en la actividad del clon 2KD1 frente a esas mismas cepas: Wa (G1P[8]I1), DS1 (G2P[4]I2), F45 (G9P[8]I1) y la cepa local Arg720 (G12P[9]I3). Asimismo, se estudió la capacidad de ambos clones para neutralizar *in vitro* a la cepa de RVA murino ECw (G16P[16]I7) utilizada en los ensayos en el modelo ratón lactante. La técnica de detección de anticuerpos neutralizantes contra RVA por reducción de focos fluorescentes utilizada fue descrita exhaustivamente en trabajos anteriores [161]. Brevemente, las muestras fueron diluidas en base 5 e incubadas con igual volumen de una suspensión de RVA bovino INDIANA correspondiente a 100 DICT (Dosis Infecciosa de Cultivo de Tejidos). Luego de 1 hora de incubación a 37°C y 5% CO₂, se transfirieron 100 µl de la mezcla muestra-virus sobre monocapas de células MA-104. Las placas fueron incubadas en iguales condiciones durante otras 48 horas. El virus residual no neutralizado y capaz de infectar a las células fue revelado por inmunofluorescencia como ya fue descrito en la

sección anterior. El título de anticuerpos virus neutralizantes se expresó como la inversa de la máxima dilución donde se produjo una reducción mayor o igual al 80% de la cantidad de focos fluorescentes.

4.4.2 Afinidad de unión a partículas de RVA

La afinidad de unión de cada clon fue estudiada mediante un ELISA específico que detecta moléculas de VHH unidas a partículas virales. Para ello, se sensibilizaron placas (Maxisorp, NUNC) de 96 pocillos con 100 μ l de una dilución 1/5.000 de un anticuerpo IgG bovino anti-RVA en buffer carbonato-bicarbonato pH: 9.6. Todas las incubaciones se realizaron por una hora a 37°C y 5% CO₂. Luego de cada incubación, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS-tween₂₀ 0,05%. Después de la sensibilización, los pocillos fueron bloqueados con leche descremada al 10% p/v. Luego del bloqueo, se agregó sobrenadante clarificado de cultivos de MA-104 infectados con RVA bovino INDIANA con título viral no menor a 10⁷ UFF/ml (pocillos positivos) o sobrenadante de células MA-104 sin infectar (pocillos negativos), ambos en una concentración de 1/2. A continuación, se colocaron las muestras a analizar en diluciones seriadas base 5 en PBS tween 20 0,05%, por duplicado. Posteriormente, se realizaron dos pasos de incubación, el primero con un anticuerpo secundario IgG de un conejo hiperinmunizado con nanoanticuerpos VHH y el segundo con un anticuerpo comercial de cabra anti-IgG de conejo conjugado con Peroxidasa (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) en diluciones de 1/5.000 y 1/2.000 respectivamente. Luego de la última incubación a 37°C, se revelaron las placas con ABTS (Sigma-Aldrich)/ H₂O₂ y se leyeron como ya fuera descrito en la sección previa. El título de nanoanticuerpos de cada muestra, se expresó como la inversa de la mayor dilución cuya absorbancia corregida ($A_{405c} = A_{405}$ en pocillos positivos - A_{405} en pocillos negativos) resultó mayor al punto de corte de la técnica, establecido como una absorbancia cruda mayor a 0,200. Como controles positivos se utilizaron muestras de VHH con título conocido, y como muestra negativa se usó un VHH no relacionado.

Para los estudios de afinidad, se calculó el porcentaje de unión a RVA mediante una normalización de los títulos de VHH obtenidos y estos valores fueron graficados en función del logaritmo base 10 de la concentración de anticuerpos (μ g/ml). A continuación, se calcularon los valores de EC₅₀ (50% concentración máxima efectiva) para cada clon mediante

una regresión no lineal con una ecuación de dosis-respuesta sigmoidal mediante el programa GraphPad Prism 7.01 para Windows [162].

4.4.3 Resistencia proteolítica en condiciones fisiológicas

La utilización de los nanoanticuerpos VHH como terapia oral anti-RVA en pacientes pediátricos, plantea el problema de la degradación de los mismos por las enzimas gástricas e intestinales. Con el objetivo de caracterizar la susceptibilidad de los clones 2KD1 y 3B2 a la degradación proteolítica en el estómago e intestino de los ratones lactante, se realizaron, en primer lugar, ensayos de resistencia proteolítica de ambos clones en Fluido Gástrico Simulado (FGS) o Fluido Intestinal Simulado (FIS). Los fluidos fueron preparados de acuerdo a la formulación estandarizada por la Farmacopea de EE. UU. A saber, el fluido gástrico se formuló disolviendo 3,2 g de pepsina de cerdo (Sigma Aldrich) en 7 ml de HCl, llevando a un volumen de 1.000 ml con agua destilada y ajustando a un pH= 1.2 con NaOH/HCl. Por su parte, el FIS se preparó disolviendo 10 g de pancreatina (Sigma-Aldrich) en una solución formada por 6,8 g de K₂HPO₄ disueltos en 77 ml de NaOH 0,2N y llevando a un volumen de 1.000 ml con agua destilada. En este caso, el pH fue llevado a 6.8.

Los ensayos se realizaron mediante la incubación de 400 µg de VHH (400 µg de 2KD1 o 400 µg de 3B2) en 100 µl de FGS o FIS en un volumen final de 1 ml (con agua destilada) durante 60 minutos a 37°C. Se tomaron muestras a los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. La pepsina fue neutralizada mediante el agregado de 5 µl de NaOH 1M mientras que la pancreatina fue inactivada mediante la adición de un inhibidor de proteasas comercial (Sigma-Aldrich). La evolución de la cantidad de VHH funcional remanente en las muestras fue analizada mediante el ELISA para la detección de nanoanticuerpos funcionales anti-VP6 previamente descrito.

Con el objetivo de optimizar la masa de VHH funcional disponible en el intestino delgado para neutralizar la infección por RVA, se realizó un nuevo ensayo de resistencia proteolítico para ambos clones en FGS utilizando una serie de excipientes para intentar reducir la acción de las enzimas gástricas: albúmina bovina (Sigma-Aldrich), maltodextrina (Nutentar, Buenos Aires, Argentina) SRO (Roux Ocefa, Buenos Aires, Argentina) o caseína (cedida por INTI Lácteos). En el caso de la albúmina bovina y la caseína, se adicionó una masa equivalente a la de los nanoanticuerpos, con la finalidad de que estos

excipientes compitieran como sustrato proteico de la pepsina en lugar de los VHH. La maltodextrina, por su parte, seleccionada en base a su utilización como excipiente de otro nanoanticuerpo VHH anti-RVA (ARP1) en el primer ensayo clínico para el tratamiento de la diarrea asociada a RVA en pacientes pediátricos tratados pasivamente con anticuerpos VHH [151]. En este caso, se respetó la relación VHH/maltodextrina utilizada en el ensayo clínico: 2 mg. Las SRO son, como ya se mencionó previamente, la terapia más utilizada en los casos clínicos de diarrea asociada a RVA para prevenir la deshidratación de los niños afectados [72]. En este sentido, la administración conjunta de los nanoanticuerpos y SRO contribuiría a disminuir la severidad de la infección y la diarrea causada por RVA, mientras que aportaría nuevos electrolitos para paliar el cuadro clínico de deshidratación en pacientes pediátricos. Por otra parte, la composición de las sales podría disminuir la degradación causada por las enzimas gástricas mediante su inactivación parcial por la modificación del pH estomacal. En este caso, se utilizaron SRO comerciales liofilizadas (Roux-Ocefa) con una composición de: 3,5 g de NaCl, 1,5 g de KCl, 2,9 g de $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$, 20 g de glucosa. Para su utilización se resuspendió el polvo liofilizado en 1.000 ml de agua destilada y los 400 μg de 2KD1 o 3B2 fueron disueltos en SRO hasta alcanzar un volumen final de 1 ml.

4.4.4 Estabilidad de VHH anti-VP6 en SRO

En base a los resultados obtenidos en la sección previa y con el objetivo de determinar la concentración óptima de SRO para su administración conjunta con los VHH, se realizó un nuevo ensayo de incubación de 3B2 (400 μg) en FGS durante 60 minutos utilizando concentraciones decrecientes de las SRO: 800 μl , 400 μl y 200 μl . Se tomaron muestras a los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos y se analizaron por ELISA como ya fuera descrito.

Por otra parte, con la finalidad de evaluar la estabilidad en el tiempo de los nanoanticuerpos en el contexto de las SRO se prepararon soluciones de 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de 2KD1/3B2 en un volumen final de 2 ml de SRO. La mitad de los tubos fueron almacenados a 4°C mientras que los restantes fueron guardados a temperatura ambiente, en ambos casos durante 30 días. A los 0, 3, 5, 10 y 30 días se tomaron muestras para su posterior análisis por ELISA.

4.4.5 Resistencia térmica

En primer lugar, se realizó un ensayo de resistencia térmica de ambos clones de VHH disueltos en SRO. Los anticuerpos fueron disueltos en una concentración de 50 µg/ml en SRO y sometidos a temperaturas crecientes, comenzando con una temperatura inicial de 37°C y finalizando con una temperatura de 100°C mediante un termociclador previamente programado. La temperatura de incubación fue aumentando 5°C cada 60 segundos. Previamente al aumento de temperatura, se obtuvo una muestra de 60 µl. Los tubos con las alícuotas obtenidas se colocaron inmediatamente en hielo. La funcionalidad remanente de los nanoanticuerpos se evaluó mediante el ELISA descrito en la sección 5.4.2.

Por otra parte, se efectuó una colaboración con el Establecimiento Lácteo San Marcos (Sunchales, Santa Fé, Argentina) para evaluar la resistencia de los VHH a dos procesos térmicos de rutina en la producción láctea comercial, en el marco del proyecto FONARSEC INTA BIO AF 03/2010. Los VHH fueron sometidos al proceso de esterilización que recibe la leche larga vida, a Ultra Alta Temperatura (UAT) y al tratamiento térmico previo a la evaporación y secado de la leche en polvo (LP). En ambos casos, el proceso se realizó en el contexto de leche bovina entera. Para ello, los clones 2KD1 y 3B2 fueron disueltos en leche en una concentración de 2 mg/L (previendo una dosis final de 500 µg/250 ml leche), se dividió el volumen total de leche con anticuerpos en dos muestras, una para cada tratamiento, y se tomaron alícuotas correspondientes al tiempo 0. Para ambos tratamientos, las muestras de VHH en leche fueron pre-incubadas para su homogeneización a 70-75°C de temperatura y 150 bares de presión. Para el tratamiento UAT, se realizó una primera incubación a 90-95°C durante 60 segundos. Luego, se efectuó la incubación en las condiciones correspondientes al proceso de Ultra Alta Temperatura, 4 segundos a 145°C. Para el tratamiento 2 (leche en polvo), la muestra fue incubada a 100°C por 30 segundos. La funcionalidad remanente de los VHH se evaluó mediante el ELISA descrito en la sección 5.4.2 y mediante el ensayo de reducción de focos fluorescentes detallado en la sección 5.4.1.

4.4.6 Resistencia al proceso de liofilización

Los países que concentran la mayor cantidad de muertes por RVA presentan escaso desarrollo económico e infraestructura sanitaria [73] por lo que las cadenas de frío son difíciles de mantener. En este sentido, resulta prioritario desarrollar terapias pasivas contra RVA en formulaciones que puedan permanecer estables a temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo. Dada la alta resistencia de los nanoanticuerpos a altas temperaturas y debido a que la presentación comercial de las SRO es en forma de un polvo liofilizado, se evaluó la resistencia al proceso de liofilización de cada clon de VHH disuelto en SRO. Para ello, se prepararon soluciones conteniendo 800 µg de 2KD1 o 3B2 en un volumen final de 2 ml de SRO por triplicado y se tomaron muestras al tiempo 0. Las soluciones fueron congeladas a una temperatura de -70°C y luego fueron liofilizadas en condiciones reguladas hasta obtener un polvo homogéneo que fue congelado nuevamente a -70°C hasta su posterior análisis. Para evaluar la funcionalidad remanente de los VHH, las muestras fueron resuspendidas en agua destilada y evaluadas junto con las muestras tomadas a tiempo 0 por medio del ELISA de funcionalidad y el ensayo de reducción de focos fluorescentes ya descritos.

4.5 PROPIEDADES ANTIVIRALES DE HIERBAS AROMÁTICAS USADAS POPULARMENTE PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIARREA

Con el objetivo de estudiar las propiedades antivirales frente a RVA de hierbas aromáticas utilizadas popularmente para el tratamiento de la diarrea y la disentería, se seleccionaron dos plantas aromáticas sobre las cuales no existían estudios previos: *Aloysia citrodora* (cedrón) y *Piper aduncum* (mático). Dichas hierbas son cultivadas en forma rutinaria por una comunidad campesina criolla en la Provincia de Mendoza y comercializadas mediante una red comunitaria. Las hierbas son identificadas y utilizadas por la comunidad para el tratamiento de diversas afecciones digestivas, en particular diarrea, “empacho”, disentería y dolores abdominales.

Las hierbas se obtuvieron como hojas desecadas previamente por exposición solar. Los extractos se obtuvieron mezclando las hojas con agua destilada a 100°C, dejando reposar la mezcla hasta que alcanzó temperatura ambiente tras lo cual fue filtrada mediante papel secante y filtros de 0,45 µm. Los extractos se prepararon con una

concentración final de 80 mg/ml. En primer lugar, se realizaron ensayos de reducción de focos fluorescentes de RVA en placas de células MA-104 de 96 pocillos. Se utilizó la cepa de RVA bovino Indiana (G6P[5]I2) que presenta una buena adaptación al cultivo *in vitro*. Los extractos fueron evaluados por cuadruplicado en una concentración de 80mg/ml frente a dosis virales variables. En los pocillos del control se adicionó el mismo volumen de MEM-D. Se emplearon dos esquemas de incubación. Por un lado, los extractos fueron incubados con las distintas concentraciones de virus durante una hora a 37°C en una placa sustituta y luego sobre las células durante 48 horas, de la misma forma en que fuera explicado en la sección 5.4.1. Por otra parte, para minimizar el efecto citotóxico de los extractos, se realizó un segundo ensayo en el cual los mismos fueron incubados durante una hora a 37°C con las concentraciones decrecientes de virus directamente sobre la placa de células. A continuación, se removió la mezcla y se reemplazó con medio fresco. La incubación continuó durante 48 horas. A partir de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, los extractos fueron evaluados en el tratamiento terapéutico de la diarrea asociada a RVA en el modelo ratón (BALB/c) lactante en el ensayo realizado en el punto 5.6.

4.6 EFICACIA COMPARATIVA EN EL TRATAMIENTO CONTRA RVA: VHH ANTI-VP6 VS OTRAS OPCIONES TERAPÉUTICAS

Para evaluar la efectividad de los VHH anti-VP6 en el tratamiento de la diarrea asociada a RVA y determinar la mejora que implicaría su uso en pacientes pediátricos, resulta primordial comparar su eficacia en relación a otras opciones terapéuticas previamente detalladas. Con este objetivo, se realizó un nuevo ensayo en el modelo de ratón (BALB/c) lactante infectado con RVA murino (ECw). En este caso, la experiencia constó de 6 grupos, cada uno formado por 4 madres y su camada, en el cual los animales fueron tratados con diferentes opciones terapéuticas: 2KD1 (50 mg/kg) +SRO; 2KD1+3B2 (50 mg/kg) +SRO; Nitazoxanida (15 mg/kg); Crema de Bismuto (750 mg/kg); infusión de *Aloysia citrodora* o cedrón (2 g/kg); infusión de *Piper aduncum* o mático (2 g/kg). Los controles incluidos en el ensayo fueron: ratones inoculados y no tratados y ratones no inoculados.

Las dosis de VHH anti-VP6 utilizadas en este ensayo fueron seleccionadas a partir de los resultados de eficacia obtenidos en los ensayos previos. Por un lado, una dosis de

200 µg de 2KD1, equivalente a 50 mg/kg, la cual había logrado la mayor eficacia en el tratamiento terapéutico de RVA. Por otra parte, se empleó una dosis de 200 µg de 2KD1+3B2, equivalente a 50 mg/kg, debido a que la utilización de dos nanoanticuerpos diferentes podría reducir la posibilidad de surgimiento de mutantes virales de escape a los VHH, si bien en los análisis previos no fue posible detectar mutante *in vivo*. En ambos casos, los VHH fueron disueltos para su administración en SRO (Roux-Ocefa) con el objetivo de reducir la degradación de los anticuerpos por las enzimas gástricas.

En el caso de la nitazoxanida (Roemmers, Buenos Aires, Argentina), la droga liofilizada fue resuspendida de acuerdo a las instrucciones del fabricante, en este caso utilizando agua destilada estéril. La nitazoxanida fue administrada en la dosis recomendada de 15 mg/kg en una única toma diaria con un volumen final de 100 µl en agua destilada, variando la masa de droga administrada de acuerdo a las variaciones de peso de los ratones lactantes. Por otra parte, la Crema de Bismuto (Denver Farma, Buenos Aires, Argentina) fue resuspendida en agua destilada estéril de acuerdo a las instrucciones proporcionadas. En este caso, se administró en una dosis diaria de 750 mg/kg mg en un volumen final de 100 µl de suspensión. En relación a las hierbas medicinales evaluadas previamente *in vitro* para establecer si poseían propiedades anti-RVA, tanto *A. citrodora* como *P. aduncum* las mismas fueron administradas en una dosis diaria de 2 g/kg, también en un volumen final de 100 µl. La determinación de las dosis utilizadas resultó compleja porque los tratamientos eran disímiles y no era sencillo unificar las dosis. En este sentido, para los VHH anti-VP6 se utilizó la mayor dosis probada en los ensayos previos mientras que para la nitazoxanida se aplicó una dosis equivalente a la recomendada por los fabricantes para pacientes pediátricos. En el caso de la Crema de Bismuto, la dosificación recomendada depende del número y frecuencia de los episodios diarreicos. Dado que en el modelo ratón lactante no es factible registrar cada deposición, la Crema de Bismuto se administró pura (luego de la preparación indicada por el fabricante) en un volumen de 100 µl lo que equivalía a una dosis de 750 µg/kg. Con respecto a las infusiones de *A. citrodora* y *P. aduncum*, no existe una dosificación estandarizada. En los experimentos desarrollados fueron administradas en una concentración de 2 g/kg.

Como ya fuera descrito para la evaluación de los VHH anti-VP6 (Fig. 10B), los ratones lactantes fueron inoculados con 1778 DD₅₀ de RVA murino (cepa ECw) al cuarto día de vida previa administración de 10 µl de NaHCO₃ (5% p/v) y comenzaron a recibir el tratamiento correspondiente, en este caso de 1 DPI a 7 DPI. Los lactantes fueron

evaluados diariamente para determinar si sufrían diarrea, recolección de muestras de heces y eutanasia secuencial y obtención de muestras de intestino y suero. Las muestras fueron procesadas posteriormente como se detalló previamente.

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los títulos virales y los títulos de anticuerpos fueron transformados utilizando el logaritmo en base 10 de los valores obtenidos. Las muestras negativas recibieron un valor arbitrario de 2 ($\log_{10}= 0,31$) para los cálculos correspondientes. Para las muestras de macerados intestinales y heces se calculó el Área Bajo la Curva (AUC) utilizando el software GraphPad (disponible en línea). Con el objetivo de comparar la duración de la diarrea y los títulos virales en heces e intestinos se utilizó un ANOVA paramétrico de un factor. Previamente, se analizó si las muestras cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante una Prueba de Shapiro-Wilks modificada y una Prueba de Levene respectivamente. Se seleccionó la prueba de Tukey para las comparaciones *a posteriori*. Cuando los supuestos del ANOVA paramétrico no se cumplían, se utilizó un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis para el análisis de los datos. La proporción de ratones con diarrea para los distintos tiempos se comparó usando el Test Exacto de Fisher a dos colas. La significancia estadística fue establecida con un $p=0,05$ para todos los análisis. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando los software Infostat® [163] y MedCalc® [164] según el caso.

5. RESULTADOS

5.1 PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA DIARREA INDUCIDA POR ROTAVIRUS A EN EL MODELO DE RATÓN (BALB/C) LACTANTE POR VHH ANTI-VP6

5.1.1 Tratamiento profiláctico

El objetivo de esta experiencia era evaluar el potencial profiláctico de los nanoanticuerpos VHH anti-VP6 2KD1 y 3B2 frente a la diarrea asociada a RVA en el modelo de ratón. Los ratones fueron tratados diariamente con cada dosis de 2KD1+3B2 (160 µg / 200 µg) desde -1 DPI hasta los 7 DPI. A los 0 DPI, recibieron el tratamiento de VHH y dos horas más tarde fueron inoculados con 1778 DD₅₀ de RVA murino (cepa ECw). La figura 14 muestra la ocurrencia de diarrea y el título de partículas de RVA infecciosas presentes en el intestino para todos los grupos a lo largo de la experiencia, a excepción del control no inoculado que no evidenció títulos virales en intestino o síntomas diarreicos a ningún tiempo (datos no presentados). La administración profiláctica de 2KD1+3B2 retrasó significativamente el inicio de la diarrea. A los 2 DPI el porcentaje de animales sintomáticos disminuyó del 100% de los ratones en el control no tratado al 15% de los ratones tratados con 160 µg de 2KD1+3B2 ($p < 0,0001$) y al 44% de los ratones tratados con 200 µg de 2KD1+3B2 ($p < 0,0001$) (Fig. 14). Contrariamente a lo esperado, el porcentaje de ratones tratados con 200 µg de los VHH con diarrea fue significativamente mayor al porcentaje de ratones afectados que recibían 160 µg del tratamiento ($p = 0,02$), aunque estas diferencias no se mantuvieron a partir de los 3 DPI. En términos generales, la duración de la diarrea se redujo significativamente en los grupos tratados a 3,25 días (160 µg de 2KD1+3B2) y 3,75 días (200 µg de 2KD1+3B2) respecto de los 6,75 días que presentó el control no tratado ($p = 0,001$).

Con el objetivo de evaluar si la administración oral profiláctica de los nanoanticuerpos VHH podía afectar la respuesta inmune humoral del hospedador contra RVA, se analizaron muestras de suero y contenido intestinal a los 0, 8 y 40 DPI de ratones tratados profilácticamente con VHH anti-VP6. Debido al escaso volumen de las muestras obtenidas, se detectaron los isotipos predominantes en cada tejido: anticuerpos anti-RVA IgG en suero y anticuerpos anti-RVA IgA en contenido intestinal. A los 8 DPI, los

ratones tratados con la dosis más alta (200 µg) no presentaron títulos detectables de anticuerpos IgA anti-RVA en el tejido intestinal a diferencia de los animales tratados con 160 µg de VHH y el control no tratado, que no presentaron diferencias significativas entre sí ($p>0,05$) (Fig. 14). Entre los 8 y 40 DPI, los títulos de anticuerpos IgA anti-RVA aumentaron en todos los grupos experimentales, inclusive en los tratados con 200 µg de VHH, aunque el control no tratado presentó títulos significativamente mayores que ambos grupos tratados ($p=0,001$) (Fig. 14).

Los anticuerpos séricos IgG anti-RVA mostraron un patrón similar (Fig. 14). A los 8 DPI, los ratones tratados profilácticamente con 200 µg de VHH presentaron títulos significativamente menores que el control no tratado ($p=0,006$) mientras que los ratones tratados con 160 µg de VHH mostraron títulos similares a los hallados en el control sin tratamiento ($p>0,05$) (Fig. 14). A los 40 DPI, los títulos de anticuerpos IgG aumentaron para todos los grupos pero los ratones tratados presentaron títulos de anticuerpos significativamente menores que el control no tratado ($p=0,002$) (Fig. 14).

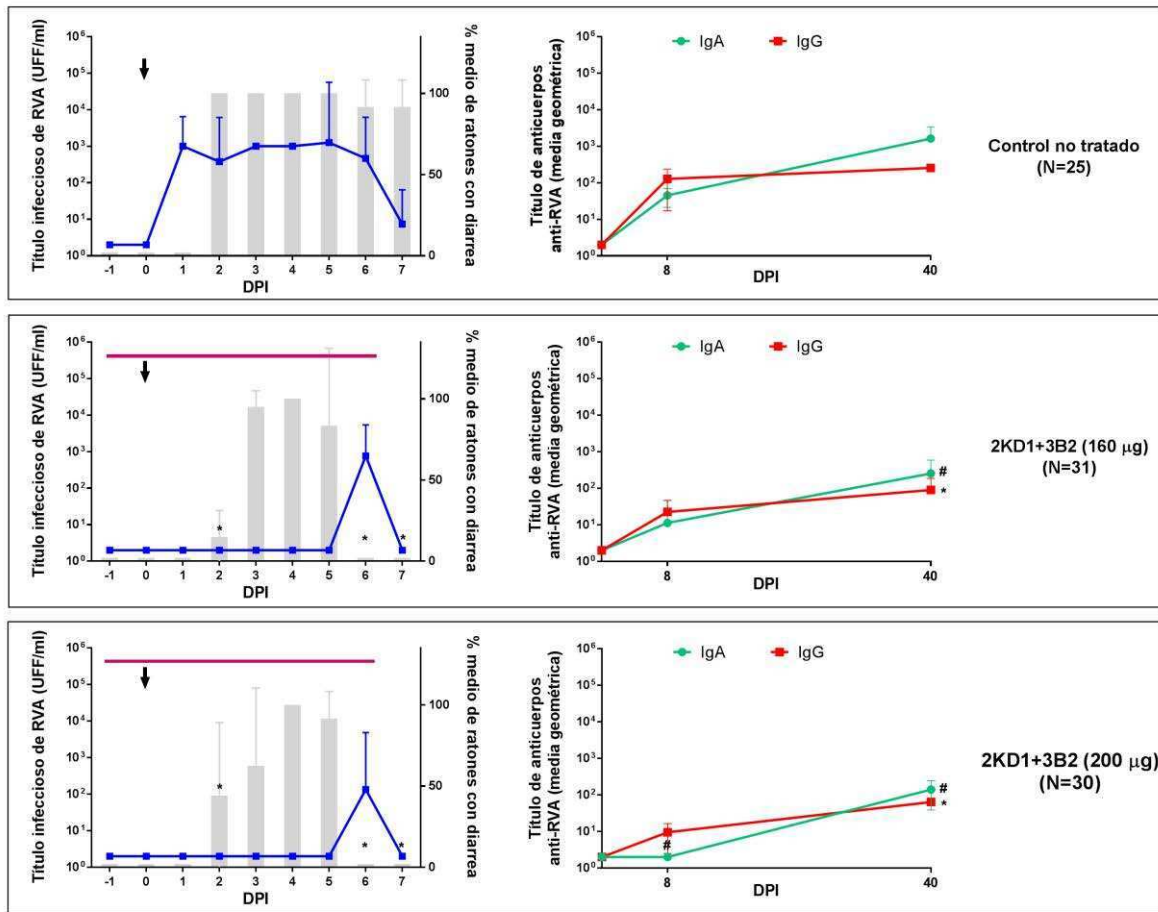


Figura 14. Efecto de la administración profiláctica de 2KD1+3B2 sobre la diarrea inducida por RVA y la respuesta inmune humoral contra RVA. Todos los ratones fueron inoculados con 1778 DD₅₀ al cuarto día de vida (0 DPI) como indica la flecha. Los ratones fueron sacrificados en forma secuencial para obtener muestras de intestino (3-4 ratones por punto). Los gráficos en el lado izquierdo del panel muestran la prevalencia de la diarrea y la infección intestinal por RVA. Las líneas azules muestran la evolución del título infeccioso de RVA en intestino (por CCIF) mientras que las barras verticales exponen el porcentaje de ratones afectados con diarrea por grupo. El símbolo * indica que la prevalencia de diarrea a ese tiempo fue significativamente menor que en el control no tratado (Test de Fisher). La línea horizontal delgada indica la duración del tratamiento pasivo con VHH. Los gráficos ubicados en el lado derecho del panel muestran la respuesta inmune humoral contra RVA. Los títulos de anticuerpos IgA intestinales e IgG séricos fueron determinados por ELISA a los 0, 8 y 40 DPI. Los símbolos # y * indican que los títulos de anticuerpos anti-RVA intestinales y séricos fueron significativamente menores que en el control no tratado, respectivamente (ANOVA). DPI: días post-inoculación.

La carga viral infecciosa en el intestino fue evaluada mediante CCIF utilizando las muestras obtenidas a partir de las eutanasias secuenciales (Fig. 14). Ninguno de los

grupos tratados con los VHH evidenció infección intestinal de 0 a 5 DPI, mientras que los ratones del control no tratado presentaron partículas virales infecciosas en forma sostenida desde 1 DPI hasta el final de la experiencia. Esto implicó una reducción significativa en la severidad de la infección de los grupos que recibieron el tratamiento pasivo con los VHH frente al control no tratado (comparación de AUC, $p < 0,0001$). A los 6 DPI, se observó un único pico de infección en el 75% (3/4) de las camadas de los grupos tratados con ambas dosis de los VHH (Fig. 14), sin que existieran diferencias significativas entre ambas dosis de tratamiento ($p > 0,05$). Por otra parte, no se detectó excreción viral en las heces de los ratones pertenecientes a los grupos tratados, mientras que el control no tratado evidenció excreción sostenida de RVA en las heces entre los 2 y 7 DPI (Fig. 15).

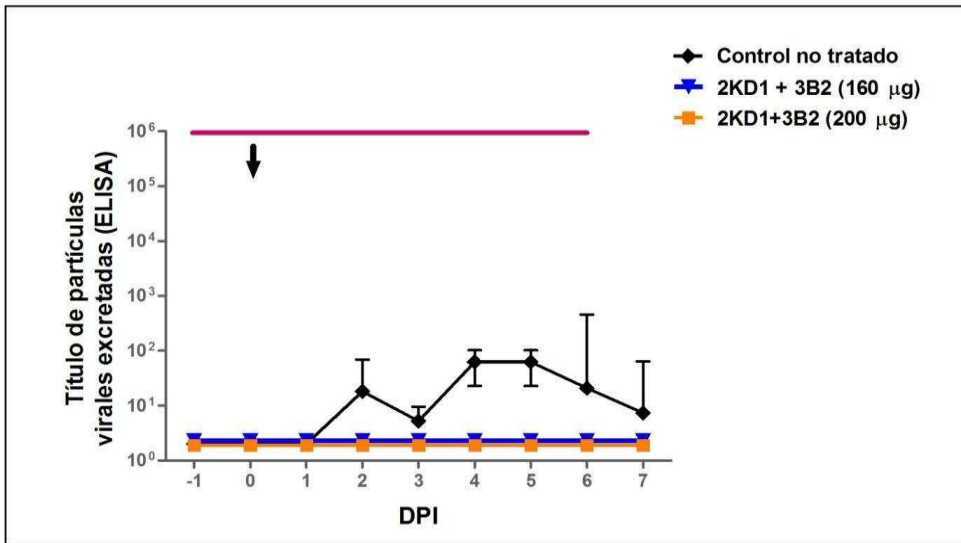


Figura 15. Efecto de la administración profiláctica de 2KD1+3B2 sobre la excreción de partículas de RVA en heces en los grupos tratados y el control no tratado. La flecha muestra el tiempo de la inoculación viral y la línea fina horizontal marca la duración del tratamiento pasivo. DPI: días post-inoculación.

5.1.2 Tratamiento terapéutico pre-sintomático

Con el propósito de estudiar la eficacia de los nanoanticuerpos 2KD1 y 3B2 como agentes terapéuticos contra la diarrea inducida por RVA, se realizó un primer experimento en el cual la administración del tratamiento pasivo se retrasó dos días. Los ratones fueron inoculados a los 4 días de vida (0 DPI) con 1778 DD₅₀ de RVA murino (cepa ECw) y

recibieron una dosis diaria de nanoanticuerpos VHH desde 1 DPI (24 horas después de la inoculación) hasta los 7 DPI inclusive. Se utilizaron 4 grupos de ratones, cada uno compuesto por 4 madres y sus camadas, para cada tratamiento: 160 µg de 2KD1+3B2, 200 µg de 2KD1+3B2, 200 µg de 2KD1, 200 µg de 3B2. Asimismo, se incluyó un grupo de ratones inoculados no tratados como control. A los 2 DPI los ratones de todos los grupos experimentales presentaban diarrea (Fig. 16). A los 6 DPI, el porcentaje de ratones con diarrea disminuyó significativamente respecto del control no tratado en los grupos tratados con 200 µg de 2KD1+3B2 ($p=0,0003$), 200 µg de 2KD1 ($p=0,0003$) y 200 µg de 3B2 ($p=0,0009$). A los 7 DPI, ninguno de los ratones en estos grupos experimentales presentaba síntomas (Fig. 16), lo que implicó una reducción significativa en la duración de la diarrea de 6,75 días en el control no tratado a una media de 4,75 días en los ratones tratados con 200 µg/dosis de los VHH ($p=0,002$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos que recibieron 200 µg de 2KD1, 3B2 o la mezcla 1:1 de ambos clones ($p>0,05$). Por otra parte, los ratones tratados con 160 µg de 2KD1+3B2 evidenciaron una tendencia decreciente en el porcentaje de ratones con síntomas diarreicos a partir de los 6 DPI (62,5%) pero esta dosis no logró una reducción significativa en relación al control no tratado ($p>0,05$).

En relación al título infeccioso en las muestras intestinales, los ratones tratados con 160 y 200 µg de 2KD1+3B2 y 200 µg de 2KD1 sólo presentaron partículas infecciosas de RVA 1 DPI (Fig. 16). A los 2 DPI, estos grupos experimentales evidenciaron títulos significativamente menores al ser comparados con el control no tratado ($p=0,02$), que mostró infección sostenida por RVA en el tejido intestinal de 1 a 6 DPI (Fig. 16). Por otro lado, los ratones tratados con 200 µg de 3B2 presentaron resultados contradictorios: mientras la mitad de las camadas (2/4) mostró infección intestinal por RVA durante todo el tratamiento, en las camadas restantes no se detectaron partículas de RVA infecciosas en ningún momento de la experiencia (Fig. 16). Sin embargo, incluso en aquellas camadas positivas para RVA, los títulos intestinales siempre fueron menores que los hallados en el control sin tratamiento, aunque esta diferencia no fue significativa. Todos los grupos tratados terapéuticamente con los nanoanticuerpos, excepto los que recibieron 200 µg de 3B2, disminuyeron significativamente la severidad de la infección intestinal por RVA, en relación al control no tratado (comparación de AUC, $p=0,04$).

Con respecto al desarrollo de una respuesta inmune humoral anti-RVA, todos los grupos que recibieron un tratamiento terapéutico pre-sintomático de VHH anti-VP6 desarrollaron una respuesta inmune contra el patógeno, tanto a nivel local como

sistémico. A los 8 DPI todos los grupos tratados presentaron títulos detectables de anticuerpos intestinales IgA anti-RVA, en todos los casos similares a los hallados en el control no tratado ($p>0,05$) (Fig. 16). A los 40 DPI, los títulos de anticuerpos IgA aumentaron en todos los grupos, pero los ratones sin tratamiento presentaron títulos significativamente mayores de anticuerpos ($p=0,03$) (Fig. 16). Con respecto a la respuesta sistémica, a los 8 DPI todos los ratones tratados presentaron títulos detectables de anticuerpos séricos IgG anti-RVA y no se observaron diferencias significativas entre éstos y el control no tratado ($p>0,05$). A los 40 DPI, los niveles de anticuerpos IgG crecieron para todos los grupos (Fig. 16) pero los niveles hallados en el control sin tratamiento fueron significativamente mayores ($p=0,002$), similarmente a lo que se observó para la respuesta inmune local en intestino. Llamativamente, los ratones tratados con 160 μg de 2KD1+3B2 presentaron niveles de anticuerpos IgG similares que a los 8 DPI.

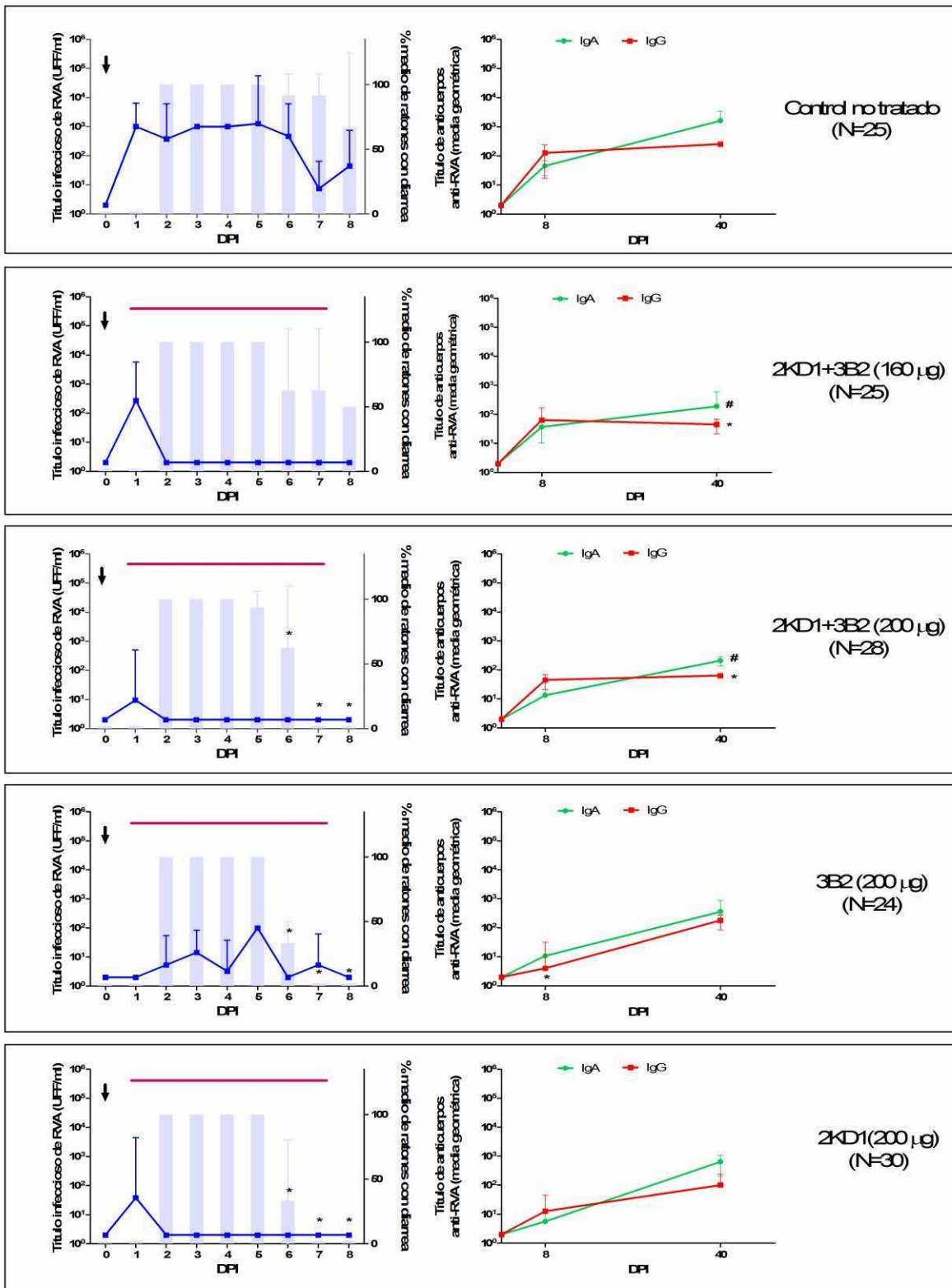


Figura 16. Efecto de la administración terapéutica pre-sintomática sobre la diarrea inducida por RVA y la respuesta inmune humoral anti-RVA. Los ratones fueron inoculados con 1778 DD50 a los 0 DPI como indica la flecha y fueron sacrificados secuencialmente para obtener muestras de intestino (3-4 ratones por punto). Los gráficos situados en el lado izquierdo del panel muestran la prevalencia de la diarrea y la infección intestinal por RVA. Las líneas azules muestran

la evolución del título infeccioso de RVA en intestino mientras que las barras verticales exponen el porcentaje de ratones afectados con diarrea por grupo. El símbolo * indica que la prevalencia de diarrea a ese tiempo fue significativamente menor que en el control no tratado (Test de Fisher). La línea horizontal delgada indica la duración del tratamiento pasivo con VHH. Los gráficos ubicados en el lado derecho del panel muestran la respuesta inmune humoral contra RVA. Los títulos de anticuerpos IgA intestinales e IgG séricos fueron determinados por ELISA a los 0, 8 y 40 DPI. Los símbolos # y * indican que los títulos de anticuerpos anti-RVA intestinales y séricos fueron significativamente menores que en el control no tratado, respectivamente (ANOVA). DPI: días post-inoculación.

La administración terapéutica pre-sintomática de los VHH logró una reducción significativa de la excreción viral en heces para todos los grupos tratados en relación al control (comparación de AUC, $p=0,01$), dado que este grupo mostró excreción continua de RVA desde los 2 hasta los 6 DPI (Fig. 17). Los ratones tratados con 200 μg de 2KD1+3B2 sólo evidenciaron excreción detectable entre 1 y 2 DPI mientras que los ratones que recibieron 200 μg de 3B2 mostraron excreción de RVA a los 2 DPI y de 5 a 7 DPI (Fig. 17). Las camadas administradas con 160 μg de 2KD1+3B2, por su parte, tuvieron un pico de excreción a los 2 DPI y uno de menor magnitud a los 6 DPI (Fig. 17). Resulta importante destacar que los ratones tratados con 200 μg de 2KD1 no mostraron excreción fecal de RVA a ningún tiempo, al menos de acuerdo a la técnica utilizada.

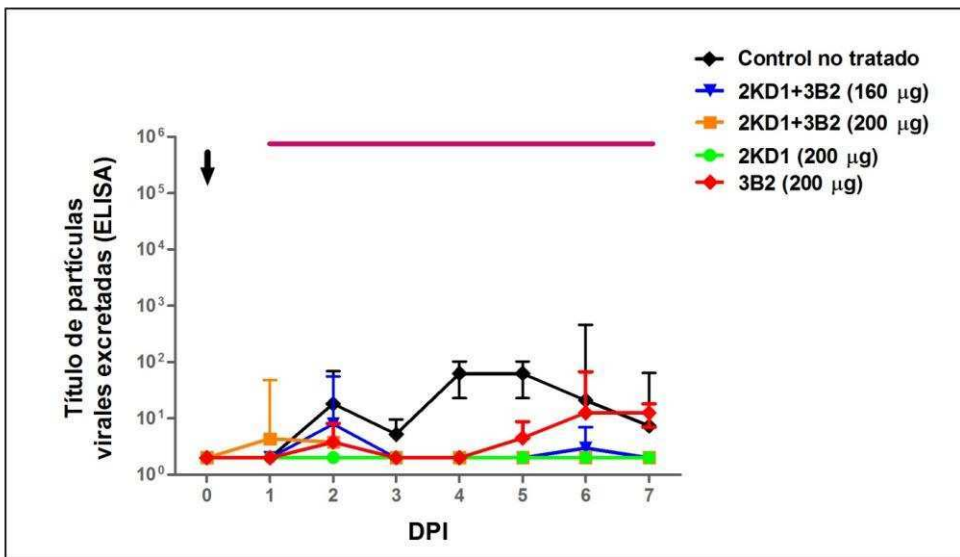


Figura 17. Efecto de la administración terapéutica pre-sintomática de los nanoanticuerpos VHH sobre la excreción de RVA en heces para los grupos tratados y el control sin tratamiento. La flecha muestra el tiempo de la inoculación viral y la línea fina horizontal marca la duración del tratamiento pasivo. DPI: días post-inoculación.

5.1.3 Tratamiento terapéutico post-sintomático

Si bien existen numerosos estudios previos que abordan la utilización profiláctica de distintos nanoanticuerpos anti-RVA, ninguno de estos trabajos analizó la eficacia de los VHH en el tratamiento terapéutico de la diarrea asociada luego de la manifestación de los primeros síntomas diarreicos. Para establecer si la administración post-sintomática de este tratamiento pasivo podría resultar efectivo contra RVA, se realizó un nuevo experimento en el modelo de ratón lactante infectado con RVA murino. En este caso, se utilizó un grupo de ratones –compuesto por 4 madres y sus camadas- infectado a los 4 días de vida con 1778 DD₅₀ de RVA murino (cepa ECw). También se incluyó un grupo control no tratado. Los ratones comenzaron a recibir su tratamiento diario consistente de 200 µg de 2KD1 a las 2 DPI y el mismo continuó hasta los 7 DPI. Elegimos la administración de esta dosis de 2KD1 debido a que había logrado resultados promisorios en los ensayos previos. Al comienzo del tratamiento (2 DPI), todos los ratones del grupo presentaban síntomas de diarrea, al igual que el control no tratado (Fig. 18). Esta situación se mantuvo constante hasta los 6 DPI, donde se observó una marcada reducción en el porcentaje de ratones afectados dentro del grupo tratado con 200 µg de 2KD1, en relación al control no tratado (Fig. 18). A los 7 DPI, sólo el 16,66% de los

ratones tratados continuaba presentando síntomas frente a un 91,67% de ratones afectados en el control sin tratamiento ($p=0,0008$). Aunque a lo largo del experimento se observó una tendencia decreciente en la duración y la severidad de la diarrea para el grupo tratado con 2KD1, la misma no alcanzó a generar diferencias significativas con el control ($p>0,05$).

En relación a la infección por RVA en el tejido intestinal, ambos grupos presentaron partículas virales infecciosas 1 DPI (Fig. 18). Sin embargo, a los 3 DPI los ratones tratados pasivamente con 200 μg de 2KD1 redujeron significativamente el título infeccioso a nivel intestinal, al ser comparados con el control sin tratamiento ($p=0,006$; Fig. 18). A lo largo de la experiencia, los ratones no tratados presentaron infección intestinal persistente por RVA hasta los 7 DPI, mientras que los ratones que recibieron el tratamiento de nanoanticuerpos VHH evidenciaron títulos infecciosos sólo a los 1-2 y 6 DPI (Fig. 18). La administración post-sintomática de 2KD1 también logró una reducción significativa de la excreción viral en heces en relación al control sin tratar (comparación de AUC, $p=0,002$) dado que, en el grupo tratado, sólo se detectó excreción entre 1 y 2 DPI (Fig. 19).

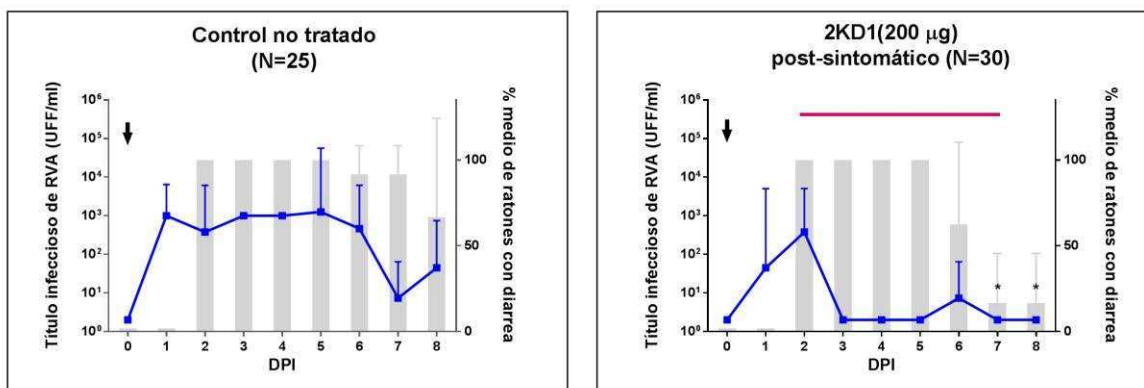


Figura 18. Efecto del tratamiento terapéutico post-sintomático sobre la diarrea inducida por RVA en el grupo tratado con 2KD1 y el control sin tratamiento. Los ratones fueron inoculados oralmente al cuarto día de vida con RVA murino (DPI 0), como indica la flecha y fueron sacrificados secuencialmente para obtener muestras de intestino (3-4 por cada tiempo). La línea azul muestra la evolución del título infeccioso intestinal por RVA mientras que las barras verticales representan el porcentaje medio de ratones con diarrea por cada grupo. El símbolo * indica que la prevalencia de diarrea fue significativamente menor que en el control no tratado (Test de Fisher). La línea horizontal delgada indica la duración del tratamiento pasivo con VHH. DPI: Días Post-Inoculación.

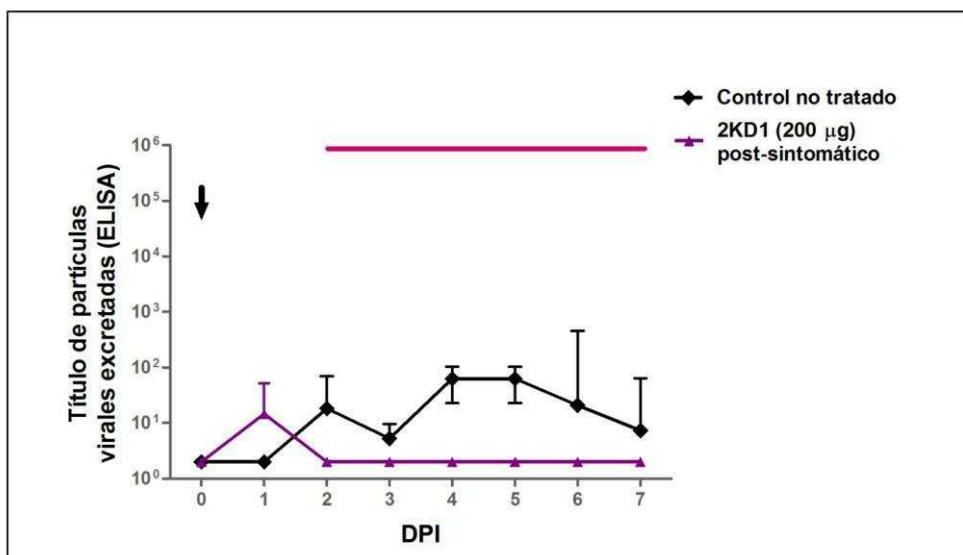


Figura 19. Efecto de la administración terapéutica post-sintomática de 2KD1 sobre la excreción de RVA en heces para el grupo tratado y el control sin tratamiento. La flecha muestra el tiempo de la inoculación viral y la línea fina horizontal marca la duración del tratamiento pasivo. DPI: Días Post-Inoculación.

5.1.4 Respuesta humoral anti-VHH del hospedador al tratamiento oral

En esta sección se abordó la posibilidad de que los ratones tratados con los VHH anti-VP6 pudieran desarrollar una respuesta humoral contra el tratamiento pasivo, una de las principales preocupaciones para cualquier terapia pasiva de anticuerpos. En primer lugar, se detectó la presencia de los VHH en el suero de los ratones tratados, para evaluar si los nanoanticuerpos eran capaces de transportarse desde el lumen intestinal a sangre periférica. La translocación de los VHH a circulación sanguínea periférica no fue comprobada a ningún tiempo para ninguno de los ratones tratados con las mayores dosis de VHH. Estos resultados sugerirían que los anticuerpos permanecen en el lumen intestinal hasta su eliminación por el sistema digestivo. Por otra parte, se analizaron muestras de suero y contenido intestinal para la detección de anticuerpos IgG e IgA anti-VHH respectivamente. En todos los casos, las muestras fueron tomadas a los 0, 8 y 40 DPI para los ratones tratados terapéuticamente con la máxima dosis (200 µg) de las distintas combinaciones de nanoanticuerpos (2KD1, 3B2 y 2KD1+3B2). Los resultados hallados muestran que no fue posible detectar anticuerpos séricos IgG contra el tratamiento pasivo en ninguna de las muestras de suero analizadas, al menos hasta 40

DPI (Fig. 20). Asimismo, no se detectaron anticuerpos IgA intestinales anti-VHH en el rango temporal analizado (datos no mostrados).

5.1.5 Inmunogenicidad sistémica de los VHH anti-VP6

Para evaluar la inmunogenicidad de los VHH anti-VP6 cuando éstos fueran aplicados por vía sistémica, se inmunizaron ratones adultos con dos dosis subcutáneas de 50 ng de 2KD1 o 3B2 en presencia y ausencia de adyuvantes. Los ratones inmunizados con 2KD1 / 3B2 en presencia de adyuvantes desarrollaron una respuesta humoral contra el tratamiento, con títulos de anticuerpos IgG séricos anti-VHH detectables luego de la primera dosis (Fig. 21). Si bien en un primer momento, los ratones inmunizados con 50 ng de 2KD1 presentaron títulos de anticuerpos menores que los ratones inoculados con la misma dosis de 3B2, estas diferencias se redujeron a los 60 DPI (Fig. 21). Por su parte, los ratones inmunizados con los VHH en ausencia de adyuvantes no mostraron títulos detectables de anticuerpos IgG séricos anti-VHH a ningún tiempo (Fig. 21).

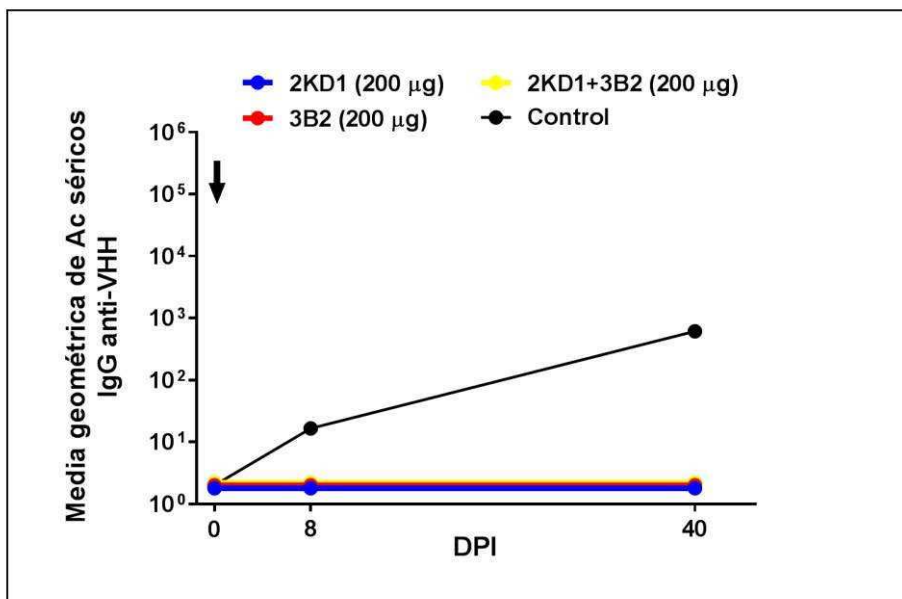


Figura 20. Respuesta inmune humoral anti-VHH en ratones tratados oralmente con VHH anti-VP6. Los títulos de anticuerpos IgG anti-VHH séricos fueron medidos a los 0, 8 y 40 DPI para los grupos de ratones tratados con 2KD1 (200 µg), 3B2 (200 µg) y 2KD1+3B2 (200 µg) y el control, un suero hiperinmune de ratón adulto vacunado con 2KD1 (50 ng) en presencia de adyuvantes. La flecha negra indica el tiempo de la inoculación con RVA murino. DPI: Días Post-Inoculación.

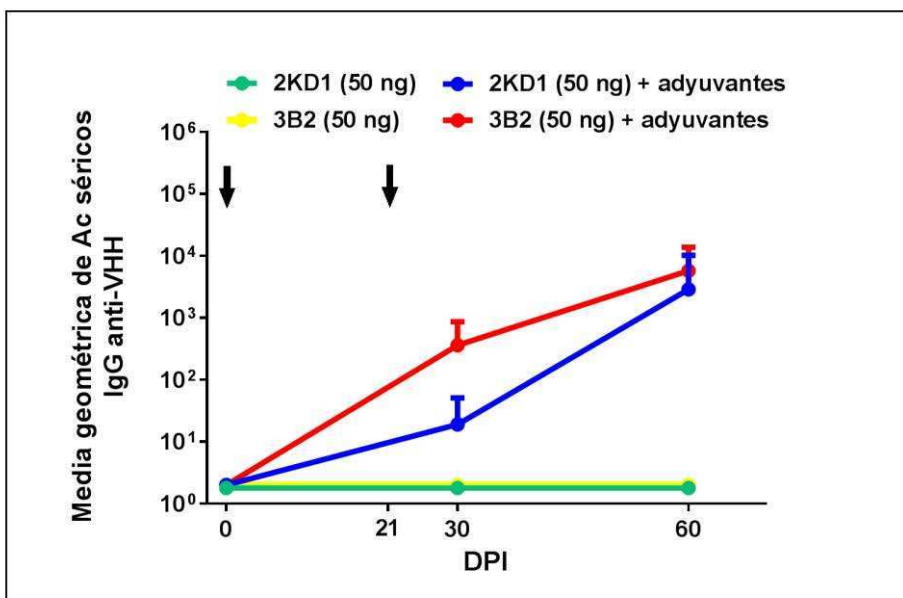


Figura 21. Respuesta inmune humoral anti-VHH en ratones inmunizados subcutáneamente con VHH anti-VP6. Los títulos de anticuerpos IgG anti-VHH séricos fueron medidos a los 0, 30 y 60 DPI para los grupos de ratones inmunizados subcutáneamente con 2KD1 (50 ng) y 3B2 (50 ng), en presencia y ausencia de adyuvantes. Para la primera inmunización se utilizó adyuvante completo de Freund mientras que para la segunda se empleó adyuvante incompleto de Freund. Las flechas negras indican el tiempo de cada inmunización. DPI: Días Post-Inoculación.

5.1.6 Surgimiento de mutantes virales de escape al tratamiento con VHH *in vivo*

Con el propósito de evaluar si la administración oral de los nanoanticuerpos VHH podía generar mutaciones en la proteína VP6 y, por tanto, mutantes virales que escaparan al tratamiento, se seleccionaron algunas muestras de materia fecal o contenido intestinal de ratones lactantes involucrados en los experimentos del Capítulo 2. Las muestras elegidas seguían los siguientes criterios:

- Eran positivas para RVA, luego de 4-6 días de tratamiento con nanoanticuerpos VHH
- Las muestras previas en ese grupo eran negativas para RVA por al menos dos días previos.

Una vez seleccionadas las muestras, se extrajo el ARN y se realizaron reacciones de PCR y posterior secuenciación del gen codificante de la proteína VP6 como ya fuera descrito previamente. Este análisis permitiría establecer si los picos de excreción fecal o intestinal de RVA observados en algunos grupos hacia el final de las experiencias podían corresponder o no a mutantes de RVA en la proteína VP6. Asimismo, se utilizó una muestra del inóculo original y dos muestras del control no tratado. En la Tabla 2 se

detallan las muestras seleccionadas y los resultados de la extracción de ARN, PCR y secuenciación.

Los análisis de las secuencias nucleotídicas del gen de VP6 no evidenciaron diferencias entre los grupos tratados con los nanoanticuerpos VHH, el control no tratado y el inóculo viral original. Efectivamente, el análisis arrojó un 100% de identidad de secuencia para todas las muestras analizadas. Los análisis filogenéticos posteriores efectuados con dichas muestras y otras secuencias de RVA murino obtenidas del GenBank confirmaron estos resultados. En efecto, todas las secuencias de los grupos tratados y sus respectivos controles fueron agrupadas en una única rama con un valor de Bootstrap del 99% (Fig. 22), mostrando una asociación con otras secuencias de RVA murino correspondientes al genotipo G16P[16]I7.

Muestra	Tratamiento	Tiempo	Extracción ARN	PCR VP6	Secuenciación
Inóculo viral	-	-	+	+	Ok
Intestinal	Control sin tratamiento	4 DPI	+	+	Ok
Intestinal	Control sin tratamiento	5 DPI	+	+	Ok
Intestinal	160µg 2KD1+3B2 profiláctico	7 DPI	+	+	Ok
Intestinal	200µg 3B2 terapéutico pre-sintomático	5 DPI	+	+	Ok
Materia fecal	200µg 3B2 terapéutico pre-sintomático	5 DPI	+	+	Ok
Materia fecal	200µg 3B2 terapéutico pre-sintomático	6 DPI	+	+	Ok
Intestinal	200µg 2KD1+3B2 profiláctico	7 DPI	-	-	-
Intestinal	200µg 2KD1 terapéutico post-sintomático	6 DPI	-	-	-
Intestinal	200µg 2KD1 terapéutico post-sintomático	6 DPI	-	-	-

Tabla 2. Muestras intestinales y de materia fecal de grupos tratados con nanoanticuerpos VHH, el control no tratado y el inóculo viral original seleccionadas para evaluar la presencia de mutaciones en el gen que codifica para VP6. En los casos en que no fue posible extraer el ARN viral, las muestras fueron descartadas. Las restantes fueron utilizadas para la amplificación del gen que codifica para VP6 y posterior secuenciación de los productos de PCR.

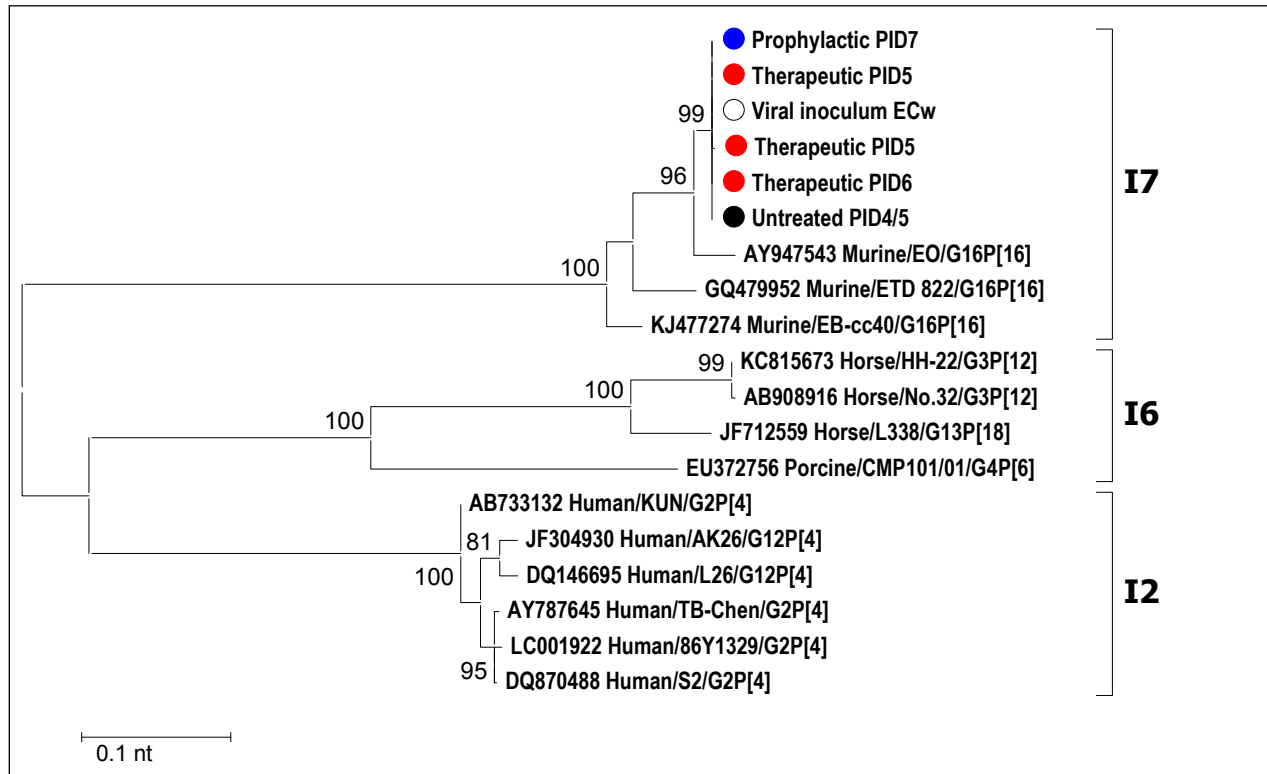


Figura 22. Análisis filogenético de las secuencias de VP6. El árbol filogenético fue construido utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de 3 parámetros de Tamura. En la figura se observa el soporte estadístico de Bootstrap con 1000 repeticiones. Las cepas de referencia utilizadas presentan el número de acceso de Genbank y el nombre de la cepa. Las muestras experimentales incluidas en el análisis se encuentran marcadas con círculos de colores: círculo azul = ratones con tratamiento profiláctico 7DPI; círculo rojo= ratones con tratamientos terapéuticos pre-sintomático; círculo negro= control sin tratamiento; círculo blanco = inóculo viral.

5.2 PREVENCIÓN DE LA DIARREA INDUCIDA POR RVA EN UN MODELO DE RATONAS TRANSGÉNICAS (B57BL/6 X CBA) F1 QUE EXPRESAN VHH ANTI-VP6 EN LECHE MATERNA

5.2.1 Detección de VHH anti-VP6 en leche de ratonas transgénicas

Durante el desarrollo de las ratonas transgénicas se evaluó la producción de VHH anti-VP6 en muestras de leche obtenidas mediante ordeño en el INIA. Los resultados obtenidos confirmaron la expresión de los nanoanticuerpos en la leche materna, tanto mediante ELISA (título: 16) como por ensayos de neutralización viral (título neutralizante

frente a RVA humano Wa: 128). Con el objetivo de confirmar la presencia de los VHH en la leche de las ratonas transgénicas utilizadas en los ensayos de protección de ratones lactantes frente a RVA, se intentó obtener nuevamente muestras de leche en el CReSA. En este caso, el ordeño debió ser realizado en forma manual con una pipeta pasteur, previa administración de oxitocina (2 UI) por no contar en las instalaciones con un dispositivo de ordeño mecánico. Desafortunadamente, la metodología usada no permitió obtener nuevas muestras de leche por lo que no fue posible cuantificar la expresión de VHH en la leche de las ratonas utilizadas en la experiencia.

5.2.2 Efecto de la ingesta continua de leche materna con VHH anti-VP6 en ratones lactantes infectados con RVA murino

Los ratones amamantados por madres transgénicas mostraron una reducción en la incidencia de diarrea severa a lo largo de la experiencia con respecto a los ratones amamantados por madres *wild Type* (Fig. 23). A los 2 DPI, el 66,67% de los ratones del grupo control *wild Type* y el 58,33% de los ratones amamantados por madres transgénicas presentaron síntomas de diarrea severa, no evidenciando diferencias significativas entre sí ($p>0,05$). Sin embargo, el porcentaje de ratones afectados en el grupo Tr/tr fue significativamente menor que en el grupo WT/wt a los 3 DPI (50% vs 95,24%, $p=0,04$) y 4 DPI (66,67% vs 100%, $p=0,045$) (Fig. 23). A los 5 DPI, todos los ratones amamantados por madres transgénicas desarrollaron diarrea severa. A los 7 DPI, el porcentaje de ratones con estos síntomas se redujo nuevamente en forma significativa en relación al control WT/wt (33,33% vs 88,9%, $p=0,04$) y al final de la experiencia (8 DPI) ninguno de los ratones en el primer grupo presentaba síntomas severos (Fig. 23).

Por otra parte, se analizó la infección intestinal por RVA a los 1, 2, 7 y 8 DPI. Debido a que los ratones transgénicos tuvieron camadas más pequeñas de lo usual en los ratones *wild type*, no fue posible evaluar la infección en intestino a todos los tiempos. Un día luego de la inoculación, los ratones TR/tr analizados presentaron un título infeccioso de 1000 UFF de RVA /ml mientras que los ratones WT/wt mostraron una media de 31.622,8 UFF/ml, aunque el bajo número de ratones transgénicos analizados no permitió establecer una comparación a nivel estadístico. A los 2 DPI, ninguno de los ratones amamantados por madres transgénicas presentaba infección por RVA detectable por CCIF en el tejido intestinal mientras que los ratones amamantados por madres *wild type*

mostraban títulos virales infecciosos significativamente mayores ($p=0,03$). A los 7 DPI, los ratones del grupo TR/tr no evidenciaban títulos infecciosos de RVA al igual que los ratones control.

Asimismo, se estudió la ocurrencia de excreción de partículas de RVA en las heces por ELISA en ambos grupos. En los ratones alimentados por madres transgénicas, se observó excreción fecal a los 2, 5 y 6 DPI. Esta tendencia implicó una reducción significativa de la excreción global respecto del control (comparación AUC, $p=0,004$) que mostró excreción sostenida desde los 2 a los 8 DPI (Fig. 24).

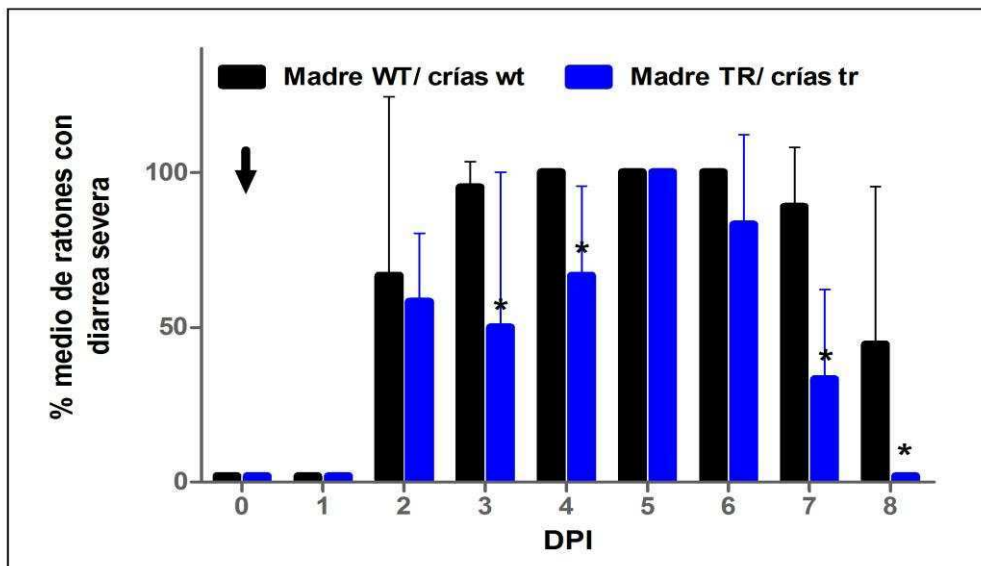


Figura 23. Evolución de la prevalencia de diarrea severa en ratones transgénicos amamantados por madres transgénicas que expresan los nanoanticuerpos 2KD1+3B2 en leche materna y en ratones *wild type* control. Las barras muestran el porcentaje medio de ratones con diarrea severa. Los asteriscos marcan una reducción significativa de los síntomas respecto del control *wild type* (Test de Fisher, $p<0.05$). La flecha muestra el tiempo de la inoculación viral. DPI: días post-inoculación.

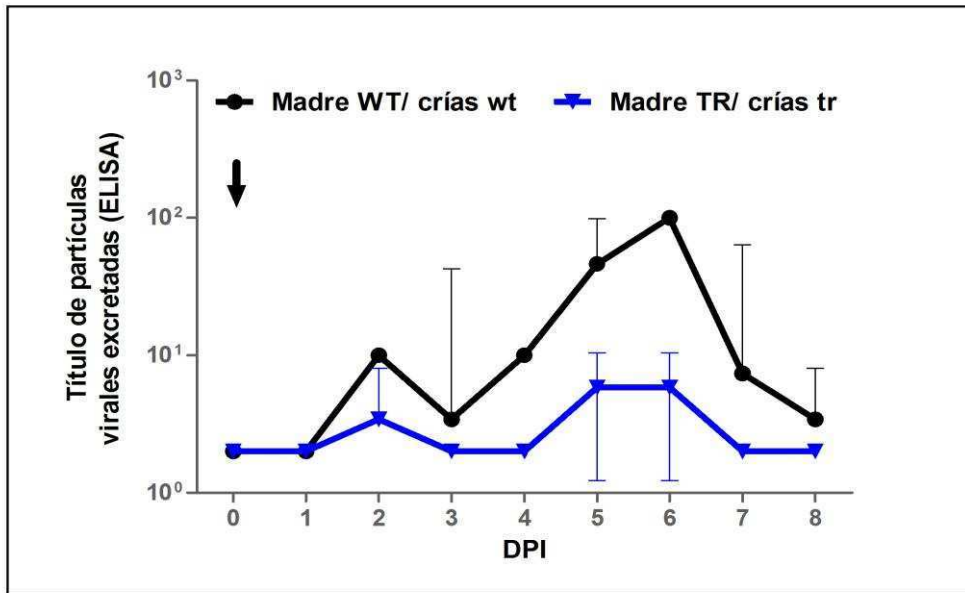


Figura 24. Excreción de partículas de RVA en heces en los ratones lactantes amamantados por madres transgénicas y el control *wild type*. La flecha indica el momento de la inoculación con RVA murino. DPI: Días Post-Inoculación.

5.2.3 Experimentos de *cross-fostering*

Con el objetivo de evaluar si las diferencias observadas en los ratones transgénicos amamantados por madres transgénicas respecto de los controles *wild type* se debían a la ingesta de calostro o leche con 2KD1+3B2, se realizó un experimento de *cross-fostering*. A los 2 DPI, aproximadamente la mitad de los ratones de ambos grupos mostraron síntomas severos de diarrea (Fig. 25). Un día más tarde (3 DPI), prácticamente todos los ratones presentaban diarrea severa (Fig. 25). Sin embargo, a los 4 DPI los ratones *wild type* amamantados por madres transgénicas evidenciaron una reducción significativa en el porcentaje de ratones afectados respecto del control *wild type* (66,67% vs 100%, $p=0,02$). Esta tendencia se mantuvo a los 5 DPI (54,55% vs 100%, $p=0,01$) y 6 DPI (11,11% vs 100%, $p=0,0001$) de acuerdo a lo esperado, hasta que finalmente, a los 7 DPI, ninguno de los ratones *wild type* amamantados por madres transgénicas presentó síntomas de diarrea severa (Fig. 25). Por su parte, los ratones transgénicos amamantados por madres *wild type* mostraron una evolución del cuadro clínico similar a la observada en el control *wild type*. Desde los 2 a los 6 DPI, los ratones lactantes de este grupo no presentaron diferencias significativas con el control ($p>0,05$) hasta que a los 7 DPI

finalmente lograron una reducción significativa en el porcentaje de ratones afectados (33,33% vs 90%, $p=0,04$) (Fig. 25).

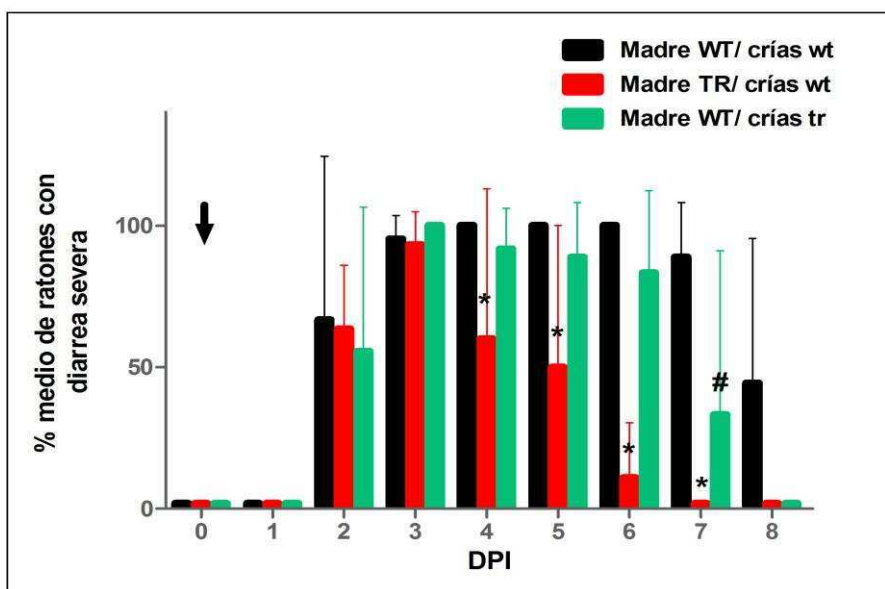


Figura 25. Evolución de la prevalencia de diarrea severa por RVA en el experimento de *cross-fostering*. Las barras muestran el porcentaje medio de ratones con diarrea severa para ratones *wild type* amamantados por madres transgénicas que expresan VHH anti-VP6 en leche materna, ratones transgénicos amamantados por ratonas *wild type* y el grupo control WT/wt. Los símbolos * y # marcan una reducción significativa de los síntomas respecto del control *wild type* (Test de Fisher). La flecha muestra el tiempo de la inoculación viral. DPI: días post-inoculación.

En relación a los títulos infecciosos en tejido intestinal, los ratones *wild type* amamantados por madres transgénicas presentaron un perfil de infección intestinal similar al observado en el control *wild type*, mostrando a algunos tiempos títulos superiores a los hallados en este grupo (Fig. 26). Por el contrario, los ratones transgénicos amamantados por madres *wild type* evidenciaron menores títulos infecciosos en el tejido intestinal, con un único pico de infección a los 3 DPI (Fig. 26). El bajo tamaño muestral de las camadas disponibles utilizadas no permitió el análisis estadístico de estos datos.

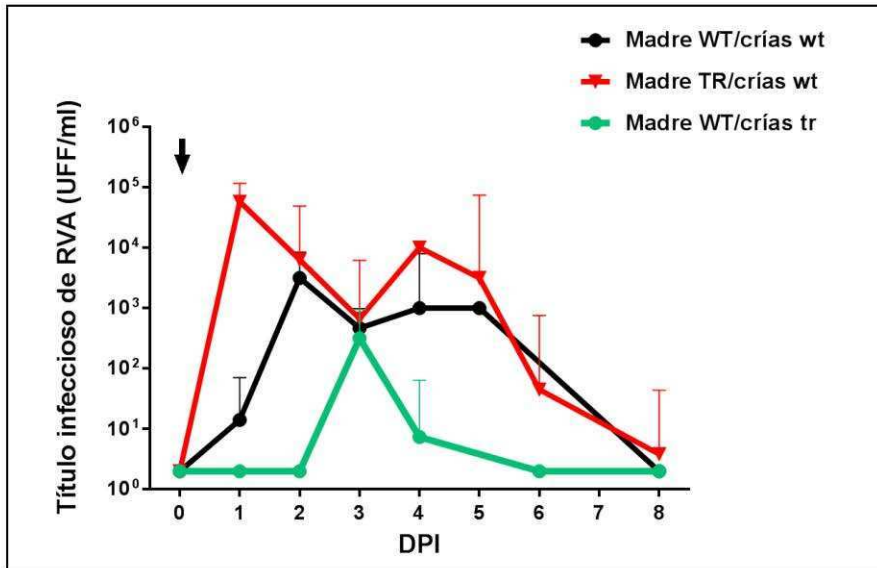


Figura 26. Evolución de la infección intestinal por RVA en el experimento de *cross-fostering*. Las líneas de colores muestran el título de partículas de RVA infecciosas (por CCIF) para ratones *wild type* amamantados por madres transgénicas que expresan VHH anti-VP6 en leche materna, ratones transgénicos amamantados por ratonas *wild type* y el grupo control WT/wt. El tamaño muestral de las camadas no permitió realizar un análisis estadístico de las diferencias observadas a cada tiempo. La flecha muestra el tiempo de la inoculación viral. DPI: días post-inoculación.

El análisis de excreción de partículas virales en heces mostró un perfil similar al observado en las muestras de contenido intestinal (Fig. 27). Efectivamente, ambos grupos de ratones involucrados en el experimento de *cross-fostering* mostraron excreción fecal de RVA sostenida a lo largo de la experiencia, no evidenciando diferencia significativas con el control *wild type* ($p > 0,05$) ni entre sí ($p > 0,05$) (Fig. 27).

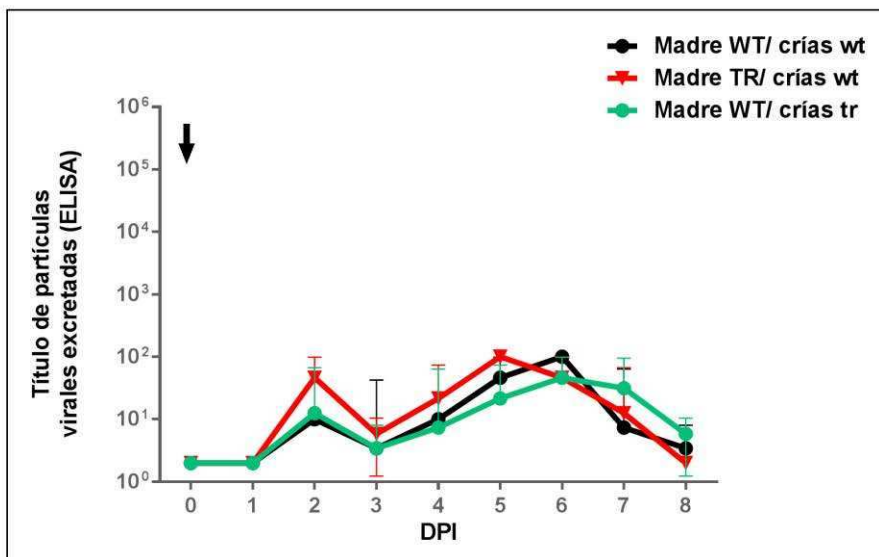


Figura 27. Excreción de partículas de RVA en heces en ratones *wild type* amamantados por madres transgénicas que expresan los nanoanticuerpos 2KD1+3B2 en leche materna, ratones transgénicos amamantados por ratonas *wild type* y el grupo control WT/wt. La flecha indica el momento de la inoculación con RVA murino. DPI: Días Post-Inoculación.

5.3 CARACTERIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE NANOANTICUERPOS VHH ANTI-VP6

5.3.1 Actividad neutralizante contra RVA

Estudios previos abordaron la actividad neutralizante de ambos clones de VHH - 2KD1 y 3B2- frente a distintas cepas de RVA [142,143]. Sin embargo, la mayor parte de los ensayos se realizaron empleando únicamente el clon 3B2. Por otra parte, dichos estudios no abordaron la capacidad neutralizante de 2KD1 y 3B2 frente a la cepa de RVA murino utilizada en los ensayos de efectividad en el modelo ratón BALB/c lactante. En este trabajo se realizaron ensayos de neutralización viral *in vitro* con el objetivo de completar la caracterización acerca de la actividad neutralizante de los VHH anti-VP6. Como se observa en la Tabla 3, ambos clones fueron capaces de neutralizar una amplia variedad de cepas virales de diferentes genotipos y hospedadores, en un rango de concentraciones de 0,06 a 3,91 µg/ml. La actividad neutralizante de ambos clones no difirió frente a las cepas de RVA humano Wa (G1P[8]I1), DS1 (G2P[4]I2) y F45 (G9P[8]I1), la cepa bovina B223 (G10P[11]I2) y la equina H2 (G3P[12]I6) (Tabla 3). Sin embargo, 2KD1 presentó una mayor actividad neutralizante que 3B2 frente a las cepas de

RVA humano Arg720 (G12P[9]I3) y las cepas bovinas C486 (G6P[1]I2) y UK (G6P[5]I2) (Tabla 3). El clon 2KD1 también mostró mayor capacidad neutralizante que 3B2 frente a la cepa de RVA murino ECw (G16P[16]I7) (0,06 µg/ml vs 0,98 µg/ml). Este dato es de particular importancia debido a que dicha cepa fue la utilizada en los estudios de prevención y tratamiento de RVA mediante VHH en el modelo ratón lactante BALB/c y transgénicos realizados en este trabajo.

Cepa RVA	Concentración neutralizante de VHH (µg VHH/ml)		
	2KD1	3B2	VHH no relacionado
Wa (G1P[8]I1)	0.20 [#]	0.20 [#]	Neg
Arg720 (G12P[9]I3)	0,98	3.91*	Neg
DS1 (G2P[4]I2)	0.24	0.24*	Neg
F45 (G9P[8]I1)	0.06	0.06*	Neg
ECw (G16P[16]I7)	0.06	0.98	Neg
C486 (G6P[1]I2)	0.98 [#]	1.95 [#]	Neg [#]
UK (G6P[5]I2)	0.98 [#]	1.95 [#]	Neg [#]
B223 (G10P[11]I2)	0.98 [#]	0.98 [#]	Neg [#]
H1 (G5P[7]I5)	Nd	0.98*	Neg*
H2 (G3P[12]I6)	3.91 [#]	3.91 [#]	Neg [#]

Tabla 3. Actividad neutralizante *in vitro* de 2KD1 y 3B2 frente a diversas cepas de RVA. Para el ensayo de neutralización viral se mezclaron diluciones base 4 de cada clon de VHH (2KD1, 3B2 y un VHH no relacionado) con un volumen equivalente de cada cepa de RVA conteniendo 100 FFU. Los valores de la tabla representan la mínima concentración de VHH capaz de reducir el 80% de las UFF de cada cepa viral. Neg = sin actividad neutralizante a la máxima concentración probada (62,5 µg/ml). Nd = no determinada. [#] Resultados obtenidos de Garaicoechea y colaboradores, 2008 [143]. * Resultados extraídos de Vega y colaboradores, 2013 [142].

5.3.2 Afinidad de unión a partículas de RVA

La afinidad de unión de cada clon a las partículas de RVA fue determinada calculando los valores de EC₅₀, como fuera descripto previamente, utilizando los datos de un ELISA que mide la concentración de nanoanticuerpos funcionales por unión a RVA.

Para ello se construyó un gráfico que muestra el porcentaje de unión del VHH a la partícula viral en función de la concentración del VHH (transformada a logaritmo) (Fig. 28). A continuación, se ajustaron las curvas obtenidas a un modelo dosis/respuesta sigmoideal no lineal con valores de R^2 de 0,990 para 2KD1 y 0,991 para 3B2. La afinidad de unión a las partículas de RVA fue tres veces mayor para 2KD1 (0,0016 $\mu\text{g/ml}$) respecto de 3B2 (0,0048 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. 28).

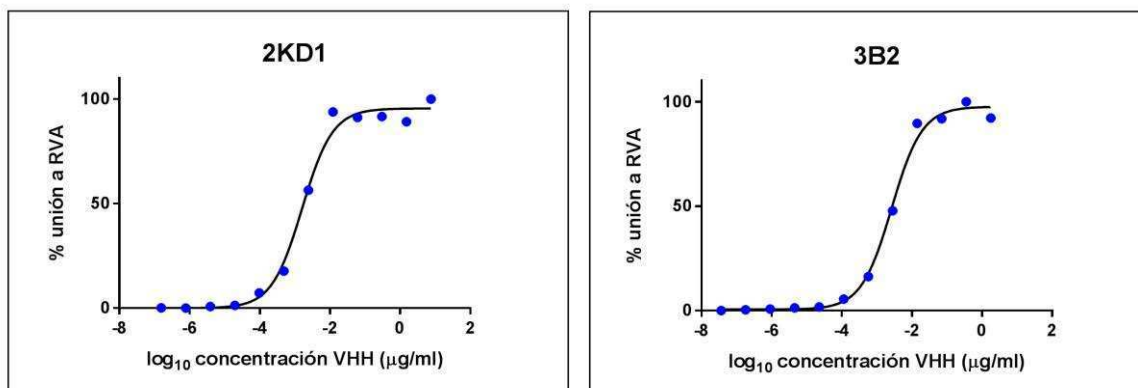


Figura 28. Afinidad de unión a partículas de RVA de nanoanticuerpos anti-VP6. Concentraciones decrecientes de 2KD1 y 3B2 fueron evaluadas para determinar la afinidad de unión a partículas de RVA inmovilizadas en un ELISA previamente descrito. Las curvas obtenidas fueron ajustadas a un modelo de dosis-respuesta sigmoideal mediante una regresión no lineal en el programa GraphPad Prism 7.01, obteniéndose valores de R^2 de 0,990 para 2KD1 y 0,991 para 3B2. A partir del análisis realizado, se calcularon los valores de EC_{50} para ambos clones.

5.3.3 Ensayos de resistencia proteolítica en condiciones fisiológicas

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de 2KD1 y 3B2 en condiciones fisiológicas que emularan el tracto digestivo, se realizaron una serie de ensayos *in vitro* incubando los nanoanticuerpos en fluidos fisiológicos simulados. A continuación, se evaluó la utilización de diferentes excipientes para disminuir la degradación mediada por enzimas digestivas y maximizar la dosis de los VHH que llega al intestino delgado y está disponible para neutralizar la infección por RVA.

5.3.3.1 Resistencia al Fluido Gástrico Simulado (FGS)

En este experimento, se incubaron los dos clones de nanoanticuerpos VHH -2KD1 y 3B2- en FGS (pepsina 0,32% p/v; pH 1.2) durante una hora, tomándose alícuotas a los 0, 15, 30 45 y 60 minutos para determinar el título remanente de nanoanticuerpos funcionales mediante la técnica de ELISA ya descrita. Tanto 2KD1 como 3B2 fueron degradados casi por completo en el FGS, con menos del 10% de 2KD1 y menos del 20% de 3B2 permaneciendo funcionales luego de una hora de incubación (Fig. 29).

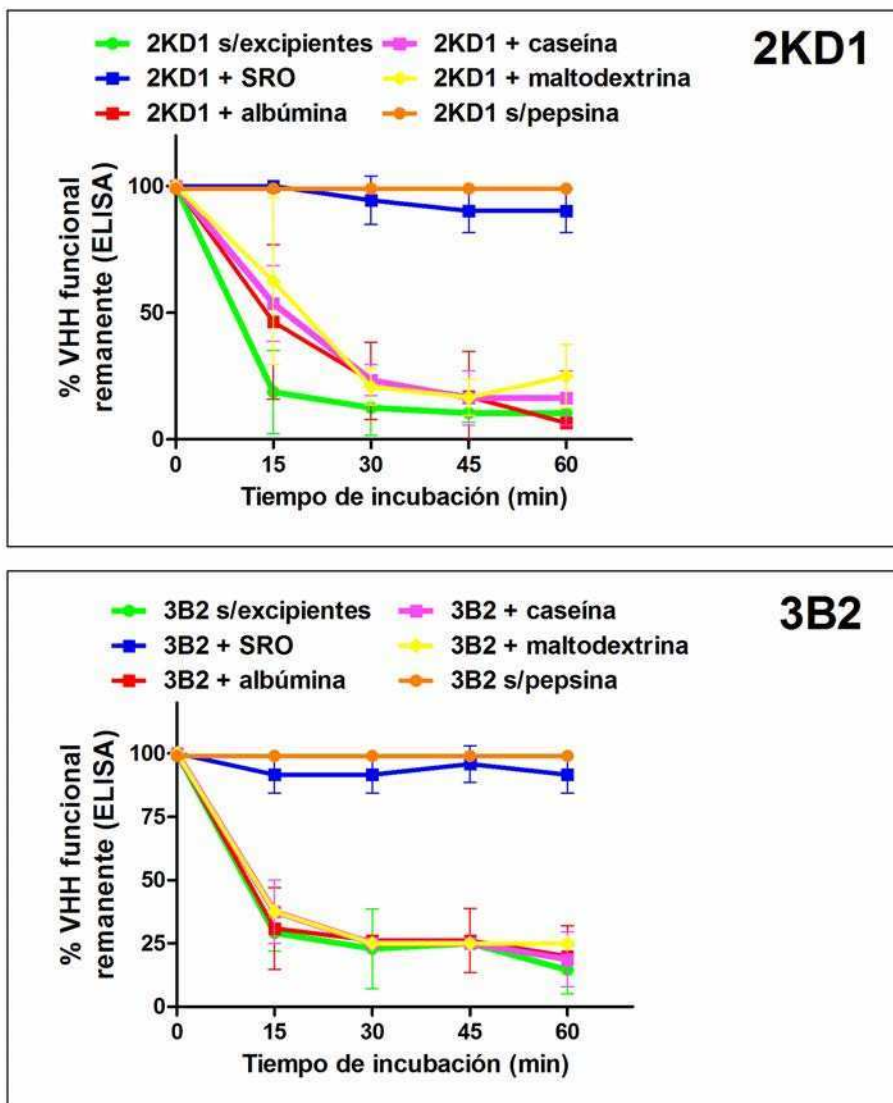


Figura 29. Resistencia proteolítica en FGS y estabilidad en pH ácido de VHH anti-VP6. Los gráficos muestran el porcentaje de VHH funcional remanente de 2KD1 (panel superior) o 3B2 (panel inferior) en función del tiempo de incubación en FGS (pepsina 0,32% p/v; pH 1.2) en presencia y en ausencia de excipientes. Asimismo, se evaluó la resistencia de los nanoanticuerpos a bajos niveles de pH, sin enzimas. En todos los casos se utilizaron 400 µg de VHH con 100 µl de FGS en un volumen final de 1 ml. Los excipientes fueron agregados en las cantidades descritas previamente: SRO (900 µl), albúmina (400 µg), caseína (400 µg), maltodextrina (2 mg). Los experimentos fueron realizados por triplicado. FGS: Fluido Gástrico Simulado. SRO: Sales de Rehidratación Oral.

Por otra parte, ambos clones permanecieron completamente funcionales luego de una hora de incubación en FGS sin pepsina, pH: 1.2, demostrando que tanto 2KD1 como 3B2 son altamente resistentes a valores de pH de hasta 1.2 (Fig. 29). Con el objetivo de

determinar si el agregado de excipientes podría disminuir la degradación proteolítica mediada por pepsina gástrica ambos clones fueron incubados en FGS en presencia de diferentes excipientes. Curiosamente, el agregado de albúmina bovina (400 µg), caseína (400 µg) o maltodextrina (2 mg) no protegió a 2KD1/3B2 de la degradación enzimática, mostrando un perfil similar al hallado en ausencia de excipientes ($p > 0,05$). Como se observa en la Figura 29, sólo las SRO protegieron a los VHH de la degradación enzimática con un 90,28% de 2KD1 y un 91,67% de 3B2 funcionales luego de una hora de incubación ($p < 0,0001$). En términos generales, ambos clones mostraron un comportamiento similar, si bien 2KD1 pareciera ser degradado más rápidamente por la pepsina que 3B2 sin que estas diferencias resultaran significativas.

5.3.3.2 Resistencia al Fluido Intestinal Simulado (FIS)

La incubación de los nanoanticuerpos en FIS (pancreatina 1% p/v; pH 6.8) provocó una degradación menor en relación a la generada por el FGS, con valores de funcionalidad remanente del 83,33% para 2KD1 y 95,83% para 3B2 luego de una hora de incubación en ausencia de excipientes (Fig. 30). La presencia de los diferentes excipientes no provocó un incremento considerable de la resistencia al FIS para ninguno de los dos clones (Fig. 30).

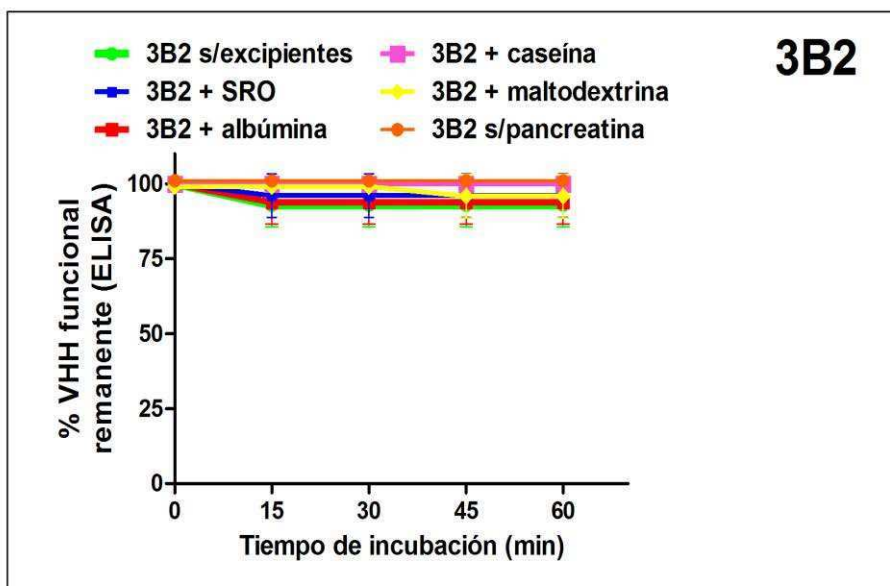
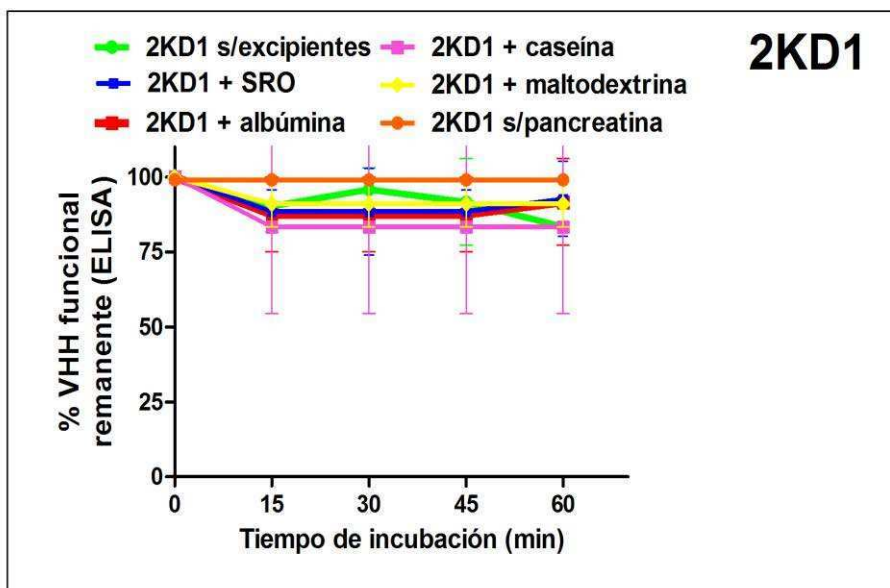


Figura 30. Resistencia proteolítica en FIS de nanoanticuerpos VHH anti-VP6. Los gráficos muestran el porcentaje de VHH funcional remanente de 2KD1 (panel superior) o 3B2 (panel inferior) en función del tiempo de incubación en FIS (pancreatina 1% p/v; pH 6.8) en presencia y en ausencia de excipientes. En todos los casos se utilizaron 400 µg de VHH con 100 µl de FIS en un volumen final de 1 ml. Los excipientes fueron agregados en las cantidades descritas previamente: SRO (900 µl), albúmina (400 µg), caseína (400 µg), maltodextrina (2 mg). Los experimentos fueron realizados por triplicado. FIS: Fluido Intestinal Simulado. SRO: Sales de Rehidratación Oral.

5.3.4 Estabilidad de VHH anti-VP6 en SRO

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de resistencia proteolítica, que demostraron que la administración conjunta de los VHH con SRO permitía evitar significativamente la degradación por enzimas gástricas, se realizó un nuevo experimento. El objetivo era establecer la menor concentración óptima de SRO que permitiera contrarrestar el efecto de la pepsina gástrica. Para ello, se incubó una masa fija de 2KD1 (400 µg) en FGS durante 60 minutos utilizando concentraciones decrecientes de SRO: 80% v/v, 40% v/v, 20% v/v. Los resultados obtenidos demostraron que las SRO sólo protegieron de la degradación por pepsina gástrica cuando fueron administradas en una concentración 80% v/v (Fig. 31). Cuando esta relación disminuye (40% ó 20% v/v) las SRO no logran contrarrestar totalmente la acción de la enzima.

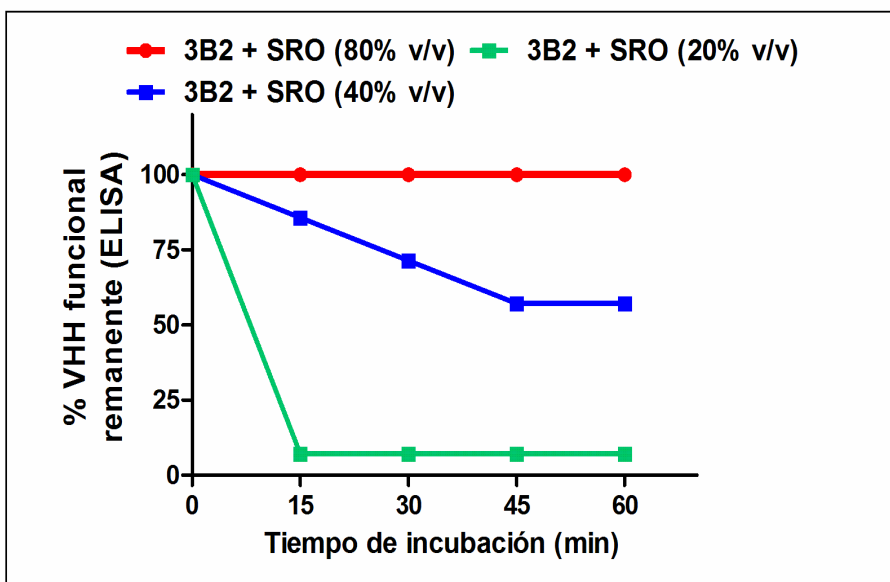


Figura 31. Resistencia proteolítica de 2KD1 frente al FGS en presencia de distintas concentraciones de SRO. Los gráficos muestran el porcentaje de VHH funcional remanente en función del tiempo de incubación en FGS (tripsina 0,32% p/v; pH 1.2) en distintas concentraciones de SRO: 80% v/v, 40% v/v, 20% v/v. En todos los casos se utilizaron 400 µg de VHH con 100 µl de FGS en un volumen final de 1 ml. El experimento fue realizado por triplicado. FGS: Fluido Gástrico Simulado. SRO: Sales de Rehidratación Oral.

Por otra parte, se evaluó la estabilidad de los VHH en SRO por períodos de tiempo más prolongados, en distintas condiciones. Para ello, se prepararon soluciones de 400

µg/ml de 2KD1/3B2 en un volumen final de 2 ml de SRO y se almacenaron a 4°C o a temperatura ambiente durante 30 días, con muestras a los 0, 3, 5, 10 y 30 días, y se midió la funcionalidad remanente por ELISA, como ya fuera descrito. Los resultados obtenidos mostraron que ambos clones mantuvieron una funcionalidad remanente superior al 85% (87,5% para 2KD1 y 100% para 3B2) hasta por un mes, cuando la preparación se mantuvo refrigerada a 4°C. Cuando la mezcla de VHH y SRO fue almacenada a temperatura ambiente, la funcionalidad remanente fue del 100% para los dos clones por hasta 10 días posteriores a la preparación, momento en el que fue descartada por presentar contaminación fúngica.

5.3.5 Resistencia térmica

5.3.5.1 Resistencia térmica *in vitro*

Se realizó un ensayo de resistencia térmica en el cual ambos clones fueron sometidos durante 30 segundos a temperaturas entre 37°C y 100°C, con incrementos de 4°C. Los resultados obtenidos mostraron que tanto 2KD1 como 3B2 permanecían estables hasta la máxima temperatura alcanzada y lograban reconocer exitosamente a las partículas virales mediante el ELISA previamente descrito. No se registraron diferencias significativas entre los 2KD1 y 3B2 ($p>0,05$).

5.3.5.2 Resistencia a procesos térmicos de la producción láctea

En el caso del tratamiento UAT, se obtuvieron valores de funcionalidad remanente por ELISA del 100% para 2KD1 y del 95% para el clon 3B2 (Fig. 32). Respecto del tratamiento térmico previo al secado de la leche en polvo (LP), los valores de funcionalidad remanente fueron del 95% para el clon 2KD1 y del 90% para 3B2. Las diferencias entre ambos clones no presentaron significancia estadística ($p>0,05$). Por otra parte, la capacidad neutralizante de ambos clones frente a RVA no fue alterada por ninguno de los dos tratamientos térmicos efectuados. En ambos casos, tanto 2KD1 como 3B2 lograron neutralizar hasta 150 UFF/ml, lo que equivale a 15 dosis infectivas.

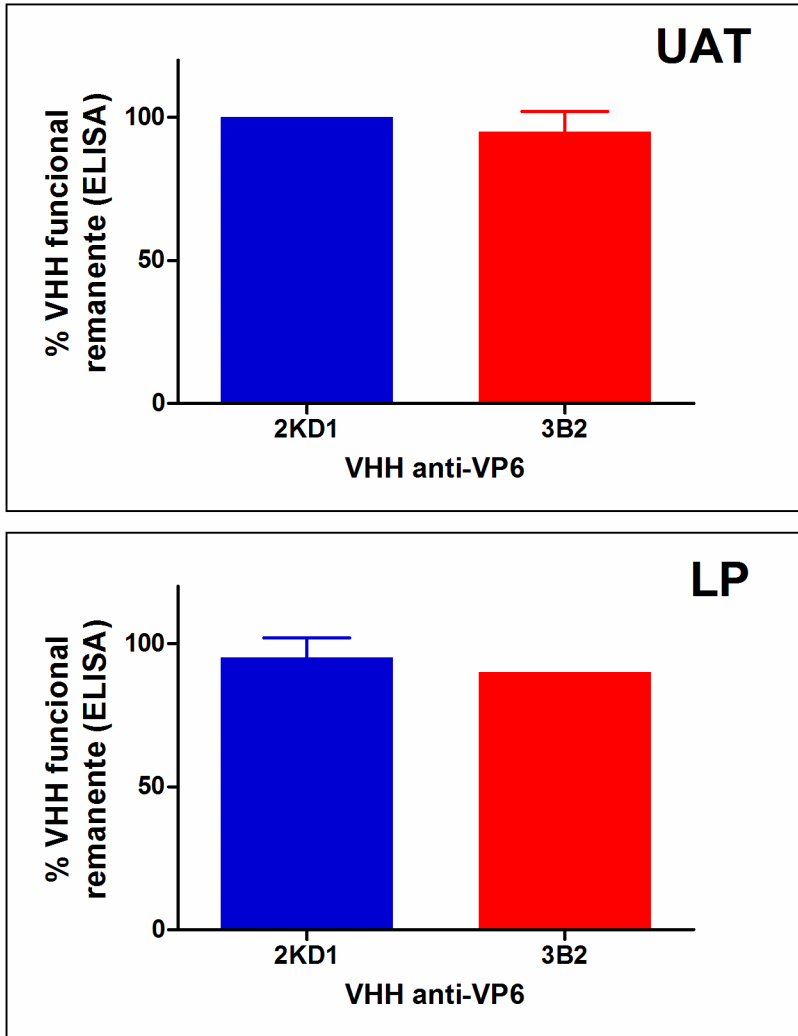


Figura 32. Resistencia de los VHH anti-VP6 a procesos térmicos de la producción láctea. Ambos clones fueron disueltos en leche bovina comercial en una concentración final de 2 mg/l. En el panel superior, se observa la resistencia de ambos clones al proceso de pasteurización a Ultra Alta Temperatura (UAT). En el panel inferior se presenta los resultados obtenidos para el proceso térmico previo al secado de la leche en polvo.

5.3.6 Resistencia al proceso de liofilización

La resistencia de ambos anticuerpos disueltos en SRO al proceso de liofilización fue evaluada por triplicado mediante el ELISA para la detección de VHH anti-VP6 funcionales y mediante el ensayo de reducción de focos fluorescentes previamente

descriptos. Los resultados obtenidos muestran que ambos anticuerpos presentaron una elevada resistencia al proceso de liofilización con un porcentaje de funcionalidad remanente del 83,33% para 2KD1 y del 95,83% para 3B2 (Fig. 33). En el mismo sentido, se observó que la capacidad neutralizante de ambos VHH se conservó luego de la liofilización obteniéndose valores del 93,33% para 2KD1 y 94,12% para 3B2. Si bien el clon 3B2 mostró valores de resistencia superiores a los observados para 2KD1 en ambos parámetros, las diferencias halladas no resultaron significativas ($p > 0,05$)

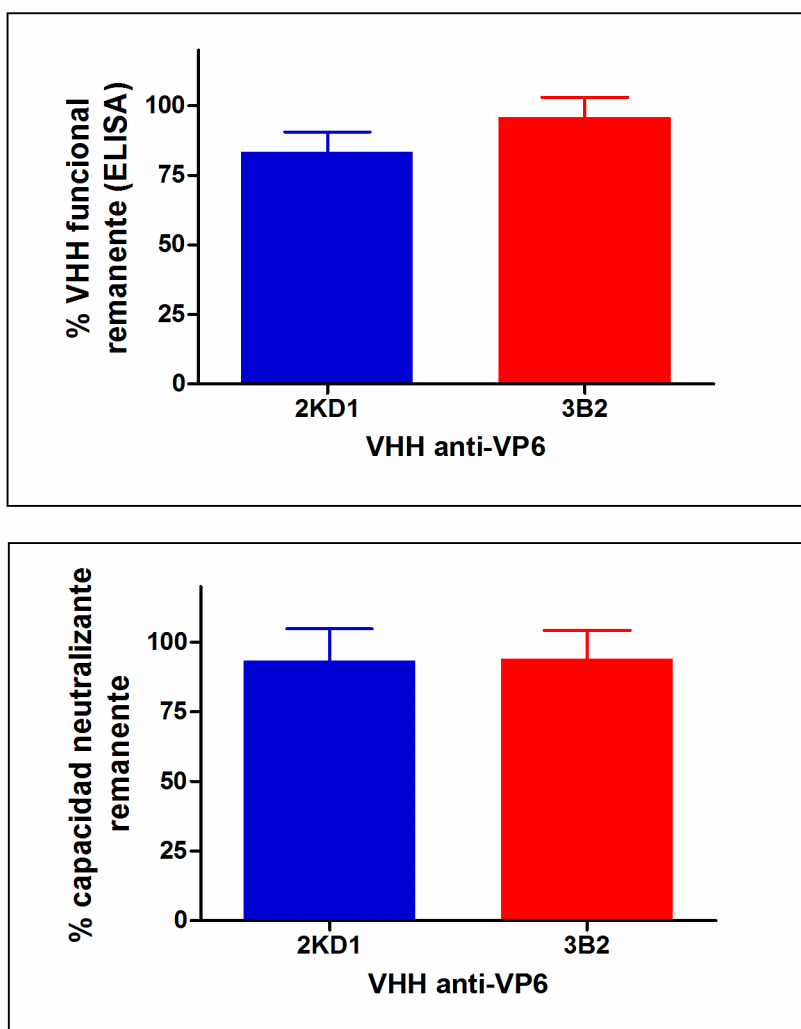


Figura 33. Resistencia de los VHH anti-VP6 al proceso de liofilización. Tanto 2KD1 como 3B2 fueron disueltos en SRO (400 $\mu\text{g/ml}$), liofilizados y posteriormente re-disueltos en agua destilada por triplicado. Todas las muestras de ambos clones fueron testeadas mediante las técnicas de ELISA (panel superior) y Ensayo de Reducción de Focos Fluorescentes (panel inferior). Si bien el clon 3B2 evidenció valores superiores a 2KD1, las diferencias no fueron significativas (Test de Fisher, $p > 0,05$).

5.4 PROPIEDADES ANTI-RVA DE HIERBAS AROMÁTICAS

En primer lugar, se evaluaron las propiedades anti-RVA de los extractos de *A. citrodora* y *P. aduncum in vitro* mediante los dos esquemas experimentales previamente detallados. En el primer experimento, en el cual se incubaron los extractos de ambas hierbas (80mg/ml) frente a concentraciones decrecientes de RVA durante 48 horas sobre placas de células MA-104, se observó que tanto *A. citrodora* como *P. aduncum* lograban reducir la infección viral frente al control (MEM-D) pero con un alto nivel de citotoxicidad que dificultaba la determinación precisa del máximo título viral inhibido (resultados no mostrados). En el segundo experimento, en el cual la incubación extractos-virus se realizó durante una hora sobre las células MA-104 (con un reemplazo posterior de la mezcla con MEM-D e incubación durante 48 horas) se observó que el extracto de *A. citrodora* reducía la infección viral en un 32,5% respecto del control de MEM-D. Esto implicó una disminución del título de RVA de 10^9 UFF/ml en el caso del inóculo a 10^6 UFF/ml en los pocillos tratados con *A. citrodora*.

En el caso de *P. aduncum* se observó un alto nivel de toxicidad en las células tratadas, incluso en este esquema experimental en el que la incubación de los extractos sobre las células sólo se prolongó durante una hora. Si bien en los cúmulos de células viables observadas no se apreció infección por RVA, el nivel de citotoxicidad era demasiado elevado para obtener resultados concluyentes. A pesar de estas limitaciones, se decidió evaluar las propiedades anti-RVA de ambas hierbas en el modelo de ratón BALB/c lactante infectados con RVA murino.

5.5 EFICACIA COMPARATIVA EN EL TRATAMIENTO DE RVA: VHH ANTI-VP6 VS OTRAS OPCIONES TERAPÉUTICAS

Con el objetivo de determinar si la administración oral de los VHH a pacientes pediátricos implicaría una mejora sustancial en el tratamiento de RVA respecto de otras opciones terapéuticas existentes, se realizó un nuevo experimento en el modelo ratón (BALB/c). Los lactantes fueron inoculados con 1778 DD₅₀ de RVA murino (cepa ECw) al cuarto día de vida (0 DPI) y comenzaron a recibir el tratamiento correspondiente desde 1 DPI hasta los 7 DPI. Los tratamientos asignados fueron: 2KD1 (50 mg/kg) + SRO; 2KD1+3B2 (50 mg/kg) + SRO; Nitazoxanida (15 mg/kg); Crema de Bismuto (750 mg/kg);

infusión de *A. citrodora* o cedrón (2 g/kg); infusión de *P. aduncum* o mático (2 g/kg). Los controles incluidos en el ensayo fueron: ratones inoculados y no tratados y ratones no inoculados.

A los 2 DPI, todos los ratones en el grupo control no tratado presentaban síntomas de diarrea severa, al igual que los grupos que recibieron ambas dosis de VHH + SRO (Fig. 35). Los ratones tratados con Crema de Bismuto y nitazoxanida también evidenciaron mayoritariamente síntomas diarreicos severos, con un 75,83% y 81,25% de ratones afectados respectivamente (Fig. 35). Por otro lado, los ratones tratados con infusiones de cedrón y mático no desarrollaron síntomas de diarrea a ese tiempo (Fig. 35), mostrando un retraso en el desarrollo del cuadro clínico. Sin embargo, a los 3 DPI los ratones de todos los grupos evidenciaban síntomas severos (Fig. 35). Hacia los 4 DPI, el grupo que recibió la Crema de Bismuto comenzó a mostrar una disminución del porcentaje de ratones afectados (Fig. 35), aunque la disminución no resultó significativa a ese tiempo ($p > 0,05$) ni tampoco a los 5 DPI ($p > 0,05$). A ese mismo tiempo, los ratones tratados con 200 μ g de 2KD1+3B2 + SRO mostraron asimismo una tendencia a la reducción de porcentaje de ratones con diarrea severa aunque ésta tampoco fue significativa en relación al control no tratado ($p > 0,05$). A los 6 DPI, todos los grupos tratados, con excepción del que recibió el tratamiento de nitazoxanida, redujeron significativamente la proporción de lactantes afectados en relación al control no tratado: 2KD1 + SRO ($p < 0,0001$), 2KD1+3B2 + SRO ($p < 0,0001$), Crema de Bismuto ($p = 0,0003$), mático ($p = 0,0003$), cedrón ($p = 0,014$). A los 7 DPI, los ratones tratados con nitazoxanida lograron finalmente reducir la cantidad de ejemplares afectados en relación al grupo no tratado ($p = 0,01$) (Fig. 35).

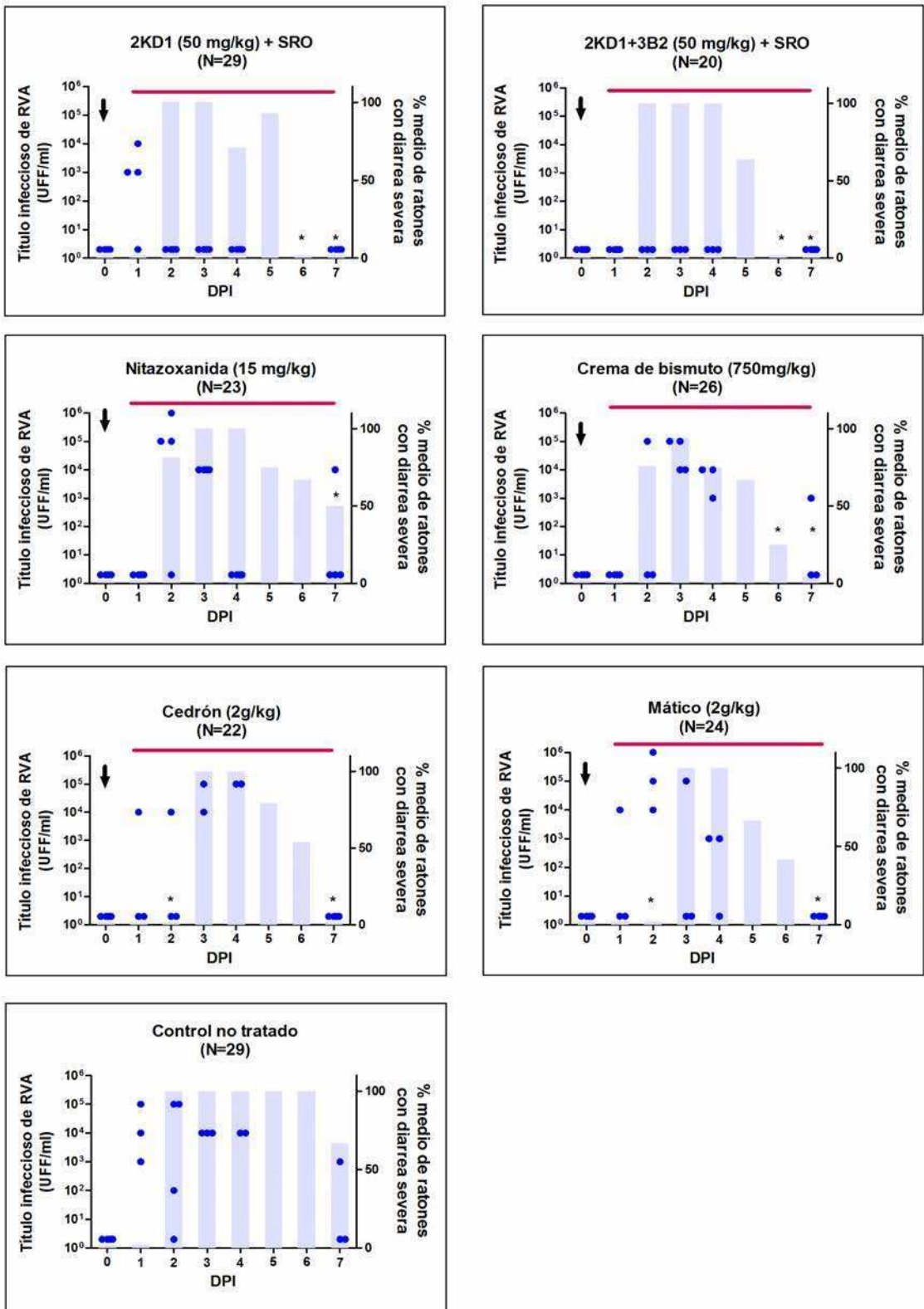


Figura 35. Efecto de diferentes alternativas terapéuticas pre-sintomáticas sobre la diarrea inducida por RVA y la infección viral intestinal. Las barras verticales exponen el porcentaje de ratones afectados con diarrea por grupo mientras que los puntos azules muestran la evolución del título infeccioso de RVA en intestino. El símbolo * indica que la prevalencia de diarrea a ese tiempo

fue significativamente menor que en el control no tratado (Test de Fisher). La línea horizontal delgada indica la duración de los distintos tratamientos pasivos. La flecha muestra el tiempo de la inoculación viral y la línea fina la duración de los tratamientos pasivos. DPI: días post-inoculación.

Los resultados obtenidos implicaron que, con excepción de los ratones tratados con nitazoxanida, todos los grupos tratados lograron una reducción en la duración de la diarrea severa con respecto al control sin tratamiento (Fig. 35), aunque esta reducción sólo resultó significativa en los grupos tratados con ambas dosis de VHH e infusiones de cedrón y mático ($p= 0,03$). En relación a la severidad del cuadro clínico, los resultados logrados fueron similares dado que, excepto los ratones administrados con nitazoxanida, todos los grupos tratados lograron una reducción significativa en la severidad de los síntomas en relación al control sin tratamiento (AUC, $p= 0,024$).

En relación a la infección intestinal por RVA, a los 1 DPI los ratones tratados con VHH anti-VP6, nitazoxanida y Crema de -Bismuto no mostraron títulos infecciosos detectables, a diferencia del control no tratado (Fig. 35). Por el contrario, los ratones tratados con infusiones de cedrón y mático no presentaron diferencias significativas con el control ($p>0,05$). A los 2 DPI, todos los grupos tratados presentaron infección intestinal por RVA similarmente a lo hallado en grupo control ($p>0,05$), a excepción de los tratados con 2KD1+3B2 (50mg/kg). A los 3DPI, los ratones a los cuales se les administraron VHH anti-VP6 no mostraron infección detectable mientras que el resto de los grupos no mostró diferencias con el control no tratado ($p>0,05$). Finalmente, a los 5 DPI la infección viral también se redujo hasta valores no detectables en los ratones tratados con nitazoxanida, al igual que los tratados con VHH anti-VP6. El resto de los grupos, por el contrario, continuó presentando infección sostenida, en forma similar al control sin tratamiento ($p>0,05$). Debido a limitaciones en el diseño experimental no pudo medirse el título infeccioso en intestino a los 5 ó 6 DPI. Hacia el final de la experiencia, la infección intestinal se redujo en todos los casos, no hallándose diferencias significativas respecto del control no tratado ($p>0,05$).

Por otro lado, tanto la administración terapéutica de ambas dosis de VHH como de nitazoxanida redujeron significativamente la excreción viral, evaluada por ELISA en materia fecal, en relación al control no tratado (AUC, $p= 0,001$) (Fig. 36). En el caso de los ratones tratados con nanoanticuerpos anti-VP6 y SRO, no se detectó excreción viral a ningún tiempo, en coincidencia con los resultados previos. Por otra parte, los grupos

tratados con Crema de Bismuto, cedrón y mático evidenciaron una reducción en la excreción fecal aunque no significativa ($p>0,05$) (Fig. 36).

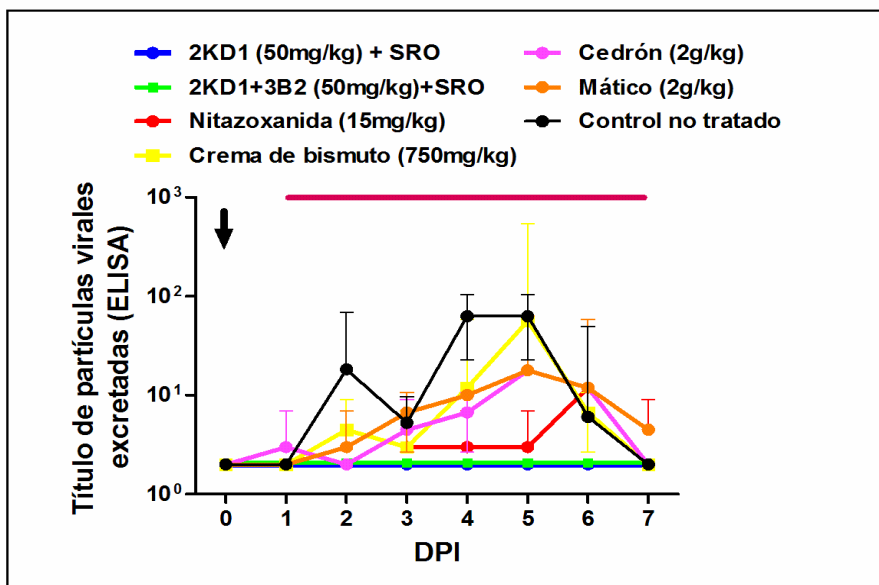


Figura 36. Excreción de RVA en heces para los grupos tratados y el control sin tratamiento. La flecha muestra el tiempo de la inoculación viral y la línea púrpura marca la duración de los tratamientos pasivos. DPI: Días Post-Inoculación.

En el experimento detallado previamente, la administración de los VHH anti-VP6 se realizó conjuntamente con SRO con el objetivo de disminuir la degradación de los nanoanticuerpos por las enzimas gástricas. En vistas a determinar si la adición de las sales implicaba una mejora significativa en la eficacia de los VHH, se realizó un análisis comparativo con los resultados obtenidos en los ensayos previos para las mismas dosis de VHH en ausencia de SRO. Como se observa en la Figura 37, la adición de SRO no produjo diferencias significativas en la eficacia del clon 2KD1 (200 μ g). La reducción de la prevalencia de diarrea severa obtenida fue similar en presencia y en ausencia de SRO (Fig. 37). En relación a la infección intestinal por RVA, tampoco se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos ($p>0,05$).

Por el contrario, en el caso de la mezcla de ambos clones, 2KD1+3B2 (50 mg/kg), la adición de SRO logró una mayor reducción del porcentaje de ratones afectados con diarrea severa (Fig. 37). A los 6 DPI, el porcentaje de ratones con síntomas severos fue significativamente menor en los animales tratados con 2KD1+3B2 (50 mg/kg) + SRO con respecto a los VHH sin aditivos ($p=0,003$). Por su parte, la infección intestinal por RVA se vio reducida por la adición de SRO al tratamiento. Pero, aunque este tratamiento logró reducir a niveles indetectables la infección por RVA, las diferencias no fueron significativas ($p>0,05$).

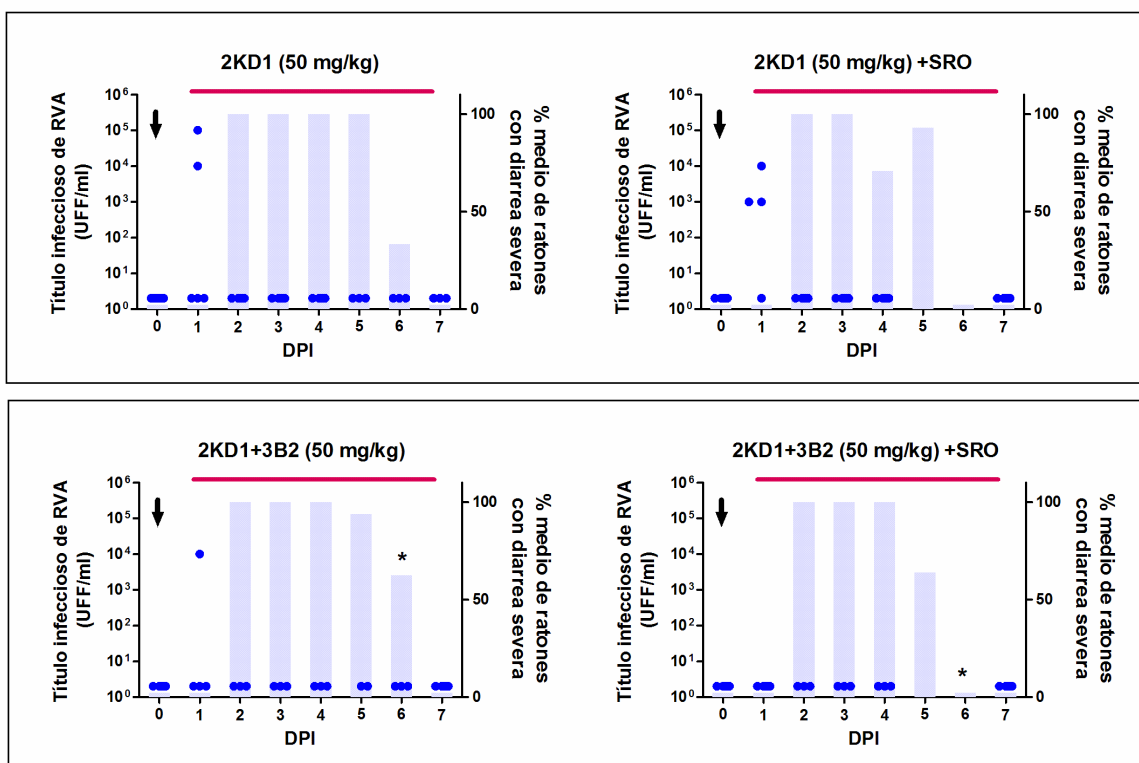


Figura 37. Efecto de las SRO sobre la eficacia de los VHH anti-VP6 en el tratamiento terapéutico de la diarrea inducida por RVA murino. Los paneles superiores muestran el efecto de la adición de SRO en los grupos tratados con 2KD1 (50 mg/kg). Los paneles inferiores exponen el efecto de la adición de SRO en los grupos tratados con 2KD1+3B2 (50 mg/kg). En todos los casos, la flecha marca el tiempo de la inoculación viral mientras que la línea horizontal delgada muestra la duración del tratamiento. Los * denotan la existencia de diferencias significativas entre los grupos. DPI: Días Post-Inoculación.

En relación a la excreción de partículas de RVA en heces, la adición de SRO no provocó diferencias en los grupos tratados con 2KD1 (50 mg/kg) dado que en ambos casos no se detectó excreción por los métodos utilizados (Fig. 38). Por otro lado, el agregado de las SRO mostró una mejora en los grupos tratados con 2KD1+3B2 (50 mg/kg) que no presentaron excreción detectable a ningún tiempo (Fig. 36) frente a los ratones tratados únicamente con VHH que mostraron excreción a los 1 y 2 DPI (Fig. 38), aunque estas diferencias no fueron significativas ($p>0,05$).

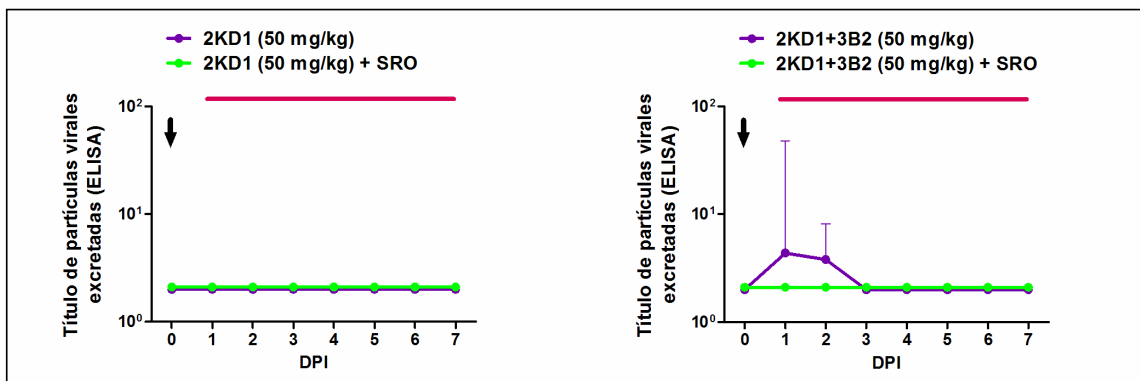


Figura 38. Efecto de las SRO sobre la eficacia de los VHH anti-VP6 en el tratamiento de la infección por RVA murino y la excreción viral en heces. El gráfico de la izquierda muestra la excreción fecal de RVA en los ratones tratados con 2KD1 (50 mg/kg) con y sin SRO. El gráfico de la derecha muestra el efecto de la adición de SRO en los ratones tratados con 2KD1+3B2 (50 mg/kg). En todos los casos, la flecha marca el tiempo de la inoculación viral mientras que la línea horizontal delgada muestra la duración del tratamiento. Los * denotan la existencia de diferencias significativas entre los grupos. DPI: Días Post-Inoculación

6. DISCUSIÓN

La gastroenteritis causada por RVA continúa representando una de las principales causas de mortalidad y morbilidad infantil a nivel mundial, con un 90% de las muertes asociadas a RVA ocurriendo en zonas de bajos recursos [5,123]. Debido a la importancia sanitaria de RVA, la OMS ha priorizado el desarrollo y la introducción de vacunas contra este patógeno [64]. En los países industrializados, las vacunas contra RVA mostraron una eficacia superior al 85% [64]. Por el contrario, en áreas empobrecidas donde la carga de la diarrea por este patógeno es más alta, la eficacia ronda alrededor del 50% [64]. Por otra parte, se ha demostrado que las vacunas a virus vivo contra RVA pueden provocar

infecciones asociadas a la vacunación en pacientes con inmunodeficiencia severa, lo que pone en duda la seguridad de estas vacunas en estos pacientes [69]. Resulta entonces relevante la generación de estrategias de prevención de RVA complementarias a la vacunación para aumentar la eficacia de la inmunización contra este agente viral.

Estudios previos han demostrado que la administración profiláctica de VHH anti-RVA mitigaba o prevenía la ocurrencia de la diarrea inducida por RVA en el modelo de ratón (BALB/c) lactante y en el modelo de cerdo gnotobiótico, respectivamente [142,143,145]. En todos los experimentos realizados en el modelo murino, el esquema experimental utilizado preveía la eutanasia final de todos los lactantes a los 4 DPI. En el caso de 2KD1 y 3B2, los estudios previos habían abordado la administración oral de cada uno de los clones por separado. Uno de los objetivos de esta tesis doctoral fue profundizar el entendimiento acerca del uso profiláctico de 2KD1 y 3B2 en el modelo de ratón lactante, con un marco temporal extendido (más allá de los 4 DPI) y utilizando una mezcla de dos clones de VHH, 2KD1 y 3B2, con el propósito de reducir la posibilidad del surgimiento de mutantes de escape al tratamiento. Este esquema experimental permitió, además, evaluar la infección intestinal por RVA a lo largo de la experiencia mediante la realización de eutanasias secuenciales de los animales.

En estas experiencias, los lactantes fueron inoculados con una dosis alta de RVA murino (1778 DD50 de la cepa EcW). Aunque los ratones neonatos son susceptibles a otras cepas de RVA hasta los 14 días de vida, elegimos utilizar una cepa viral homóloga dado que presenta mayor virulencia y replica más eficientemente en el intestino murino que otras cepas homólogas [41]. Se ha demostrado previamente que la replicación entérica de RVA murino en el intestino de ratones neonatos es entre 1.000 y 10.000 veces superior que la lograda con una cepa de RVA de origen símico [41]. Otros trabajos que han evaluado otros clones de VHH (ARP1) para el tratamiento de la diarrea inducida por RVA, utilizaron un modelo de ratón lactante infectado con RVA símico (cepa Rhesus). Más recientemente, los resultados obtenidos en un ensayo clínico realizado en pacientes pediátricos mostraron que, si bien ARP1 pudo reducir el número de deposiciones totales de heces diarreicas y los requerimientos de rehidratación, no logró reducir significativamente la duración de la diarrea [113], aunque los estudios previos en el modelo de ratón lactante con esa misma cepa habían disminuido la duración de los síntomas en los animales tratados [107,110]. Al margen de las obvias limitaciones para extrapolar resultados provenientes de un modelo animal a pruebas clínicas desarrolladas en pacientes humanos, estas diferencias entre las cepas de RVA sugerirían que el

modelo de ratón lactante infectado con una cepa viral homóloga podría predecir en forma más precisa la eficacia de un tratamiento contra RVA en seres humanos [43].

La reducción en la duración y la severidad de la diarrea causada por RVA lograda en el ensayo de administración profiláctica de 2KD1+3B2 representa el resultado más deseado en la profilaxis contra RVA dado que ni siquiera las vacunas específicas previenen el desarrollo de la diarrea sino que apuntan a reducir la duración y la severidad del cuadro clínico. La administración profiláctica también aportó a disminuir los títulos infecciosos por RVA a nivel intestinal, lo cual podría permitir una reparación más rápida del daño tisular causado por el patógeno. La reducción de la excreción viral en heces a niveles indetectables representa un elemento clave en la prevención de la diseminación viral a individuos no inmunizados. Todos los animales desarrollaron una respuesta inmune humoral contra RVA, independientemente de haber sido tratados profilácticamente con VHH anti-VP6, lo que constituye un elemento clave de análisis, particularmente en vistas a futuras exposiciones al patógeno [125,126]. Efectivamente, luego de la primoinfección con RVA es común la ocurrencia de infecciones sucesivas con otras cepas del virus. La respuesta inmune del hospedador frente a estas infecciones recurrentes depende en gran medida del desarrollo de la respuesta frente a la primera infección. En términos generales, la administración profiláctica de VHH anti-VP6 representa una estrategia de prevención efectiva contra infección por RVA y podría ser utilizada en forma complementaria a la vacunación en poblaciones donde la inmunización tradicional ha obtenido magros resultados.

El tratamiento terapéutico de RVA se basa en la administración de SRO con el objetivo de disminuir el riesgo de deshidratación, principal causa de muerte en pacientes con diarrea asociada a RVA. En los casos más severos de diarrea o en cuadros clínicos que también incluyen vómitos reiterados o malnutrición, la rehidratación se realiza por vía endovenosa, aunque esto sólo es posible en los casos en que el paciente ha sido hospitalizado. Como ya fuera descrito previamente, numerosos estudios previos abordaron la utilización de estrategias inespecíficas (drogas sintéticas, hierbas, probióticos) y específicas (anticuerpos monoclonales, IgY, calostro bovino) contra la diarrea asociada RVA en modelos animales y pruebas clínicas con pacientes pediátricos. En relación a las estrategias específicas, las mismas presentaron diversas problemáticas asociadas como el surgimiento de reacciones alérgicas, la presencia de virus adventicios, la degradación en el tracto digestivo y la dificultad de realizar un escalado a bajo costo, entre otras.

La mayor parte de los estudios previos abordaron la utilización de diferentes clones de VHH anti-VP6 en la prevención de la diarrea por RVA en modelos animales [142,143,145,152] y, en el caso de ARP1, en una prueba clínica en humanos [151]. Sin embargo, el uso de estos nanoanticuerpos para el tratamiento terapéutico de RVA no ha sido estudiado en detalle. En 2011, Pant y colaboradores evaluaron lo que denominaron la eficacia terapéutica de los clones ARP1 y ARP3 en el modelo ratón (BALB/c) lactante infectado con RVA símico (cepa Rhesus). En este caso, los nanoanticuerpos fueron administrados dos horas después de la inoculación viral, por lo que no se puede descartar la ocurrencia de una neutralización viral *in vivo* del inóculo. Efectivamente, estudios previos han demostrado que ratones lactantes alimentados con tinta china presentaban la sustancia en el recto a partir de las 3 horas posteriores a la administración [40]. En 2013, Tokuhara y colaboradores [149] realizaron un nuevo ensayo en el mismo modelo y los ratones fueron tratados con el clon ARP1 expresado en un cultivo de arroz transgénico. En este caso, el tratamiento fue administrado 9 horas después de la inoculación, lo que impediría que el inóculo viral fuese neutralizado por la primera dosis de VHH antes de lograr una infección exitosa del tejido intestinal. Sin embargo, estudios *in vitro* acerca de la cinética de infección de RVA han mostrado que recién a las 12 horas post-infección pueden detectarse las primeras partículas virales sintetizadas a partir de la primera célula infectada [165].

Con el objetivo de evaluar la eficacia de los VHH anti-VP6 como un tratamiento terapéutico pasivo contra la diarrea asociada a RVA, se realizó un segundo experimento en el cual los ratones lactantes recibieron distintas dosis de VHH desde un día posterior a la inoculación (1 DPI). La administración comenzó a este tiempo para permitir que el inóculo viral lograra establecer una infección exitosa en el tejido intestinal. La administración terapéutica de distintas combinaciones de los VHH (2KD1, 3B2, 2KD1+3B2) logró una reducción en la duración de la diarrea (en dos días) y la severidad del cuadro clínico, lo que constituye un logro relevante en cualquier tratamiento post-infección. Al igual que se observó en los experimentos de profilaxis, los síntomas diarreicos continuaron luego del fin de la excreción viral. La persistencia de la diarrea podría explicarse por la virulencia de la cepa de RVA usada. Estudios previos en el modelo de ratón lactante infectado con RVA murino reportaron que, incluso luego de que el virus no pudiera ser detectado a nivel tisular, la reparación de las capas celulares absortivas que permitiera restablecer el transporte normal de fluidos a través del epitelio requería más tiempo [44]. Ha sido sugerido que la diarrea asociada a RVA contiene un

componente secretorio mediado por la activación del sistema nervioso entérico y por la proteína viral NSP4 [7]. Como se mencionó previamente, esta proteína juega un rol clave en la regulación de la homeostasis de calcio y puede actuar como una enterotoxina viral con capacidad de activar el sistema nervioso enterico [7].

Resulta interesante observar que la misma dosis de 3B2 (200 µg) no fue capaz de disminuir la severidad de la infección a nivel intestinal, mostrando títulos virales intestinales bajos pero persistentes a lo largo de la experiencia en comparación con 2KD1. Estos datos indicarían que la administración de 2KD1 representa la mejor opción en el tratamiento terapéutico de RVA, dado que este clon logró también la reducción de la excreción viral a niveles indetectables por las técnicas utilizadas. Los resultados obtenidos son coincidentes con los hallazgos en estudios previos acerca de una mayor eficacia de este clon en la reducción de la excreción y con los parámetros de afinidad por partículas de RVA calculados en este trabajo. Efectivamente, los estudios de caracterización de ambos clones mostraron que 2KD1 posee una afinidad tres veces superior que 3B2 por las partículas de RVA. En el mismo sentido, los ensayos de reducción de focos fluorescente evidenciaron que 2KD1 lograba neutralizar a distintas cepas virales a menores concentraciones que 3B2, incluyendo a la cepa de RVA murino utilizada en los experimentos. Estudios futuros abordarán la determinación de los epitopes exactos de RVA a los que se une cada clon de VHH.

El objetivo final de las pruebas preclínicas en modelos animales es evaluar la eficacia y la seguridad del tratamiento con VHH anti-VP6 para su posterior uso en pacientes pediátricos afectados con diarrea por RVA. En este sentido, la aplicación terapéutica de esta terapia comenzará inevitablemente luego de la manifestación clínica de los primeros síntomas. Se realizó entonces un nuevo experimento en el modelo de ratón lactante que involucraba la administración terapéutica post-sintomática del VHH, de forma tal de emular más adecuadamente el potencial uso de los VHH en niños. Dado que la administración de 2KD1 (200 µg) obtuvo los mejores resultados en el tratamiento pre-sintomático de la diarrea inducida por RVA, se eligió este tratamiento. En esta experiencia, el tratamiento con 2KD1 comenzó a los 2 DPI, momento para el cual todos los ratones habían desarrollado diarrea. La administración terapéutica post-sintomática de 2KD1 logró reducir la severidad de la infección intestinal y la excreción fecal. También mostró una tendencia a la reducción en el porcentaje de ratones con diarrea hacia el final del experimento, aunque en este caso las diferencias con el control no tratado no fueron significativas. Estos resultados muestran que la administración de los anti-VP6 VHH

mitiga exitosamente la infección por RVA, incluso después de la aparición de los síntomas.

Toda terapia pasiva de anticuerpos presenta dos factores críticos concernientes a la seguridad de su uso en humanos, más aún en el caso de pacientes pediátricos. Por un lado, el posible desarrollo de una respuesta inmune del hospedador contra el tratamiento, especialmente para el caso de los anticuerpos heterólogos. Por otra parte, el posible surgimiento de mutantes virales de escape al tratamiento. Los ratones tratados oralmente con VHH anti-VP6 no desarrollaron una respuesta humoral contra los nanoanticuerpos en suero (IgG) o tejido intestinal (IgA), al menos de acuerdo a la metodología utilizada. Tampoco se detectó la translocación de los VHH a circulación periférica desde el lumen intestinal. Más aún, ratones adultos vacunados con ambos VHH en ausencia de adyuvantes no desarrollaron una respuesta inmune humoral contra los mismos, mientras que ratones adultos vacunados en presencia de adyuvantes de Freund (completo e incompleto en la primera y segunda dosis respectivamente) evidenciaron altos títulos de anticuerpos IgG anti-VHH. Estos resultados muestran que 2KD1 y 3B2 no presentan propiedades inmunogénicas propias, al menos hasta 60 días post administración, incluso al ser administrados por vía sistémica. La utilización de los VHH en pacientes pediátricos no parecería entonces implicar un riesgo en este sentido, si bien sería necesario profundizar los ensayos realizados en este trabajo para arribar a conclusiones definitivas al respecto.

Por otra parte, tampoco fue posible detectar mutantes virales de escape al tratamiento *in vivo* por modificaciones nucleotídicas en el gen de la proteína VP6, al menos de acuerdo a la metodología empleada. En este sentido, la presencia de partículas virales a los 5-6 DPI en ratones tratados, podría deberse a un retraso en la replicación viral debido a la administración del tratamiento. Como se mencionó previamente, la proteína viral VP6 se encuentra altamente conservada en diferentes cepas de RVA, lo que podría explicar la dificultad para que se generasen mutantes de escape contra nanoanticuerpos neutralizantes. Es necesario remarcar que en estudios futuros el período de observación debería ser mayor para aumentar la probabilidad de detectar posibles cepas mutantes.

Con el objetivo de evaluar el tratamiento con VHH anti-VP6 en un esquema de administración continua, se desarrollaron ratonas transgénicas que expresaban una mezcla de 2KD1 y 3B2 en leche materna. La administración continua de los VHH en la leche redujo significativamente la prevalencia de diarrea severa y retrasó el desarrollo del

cuadro clínico en relación a los ratones *wild type* control. Lo mismo ocurrió con los títulos infecciosos intestinales, aunque el bajo número de lactantes por grupo impidió un análisis estadístico adecuado. Efectivamente, las camadas de ratones transgénicos fueron en términos generales más pequeñas que las de los ratones *wild type* y presentaron mayor mortalidad. Los ratones transgénicos amamantados por madres transgénicas también disminuyeron significativamente la excreción viral en heces lo que limitaría el contagio entre animales de una misma camada. Los resultados obtenidos fueron, parcialmente, menos exitosos que los obtenidos en el modelo ratón lactante *wild type* con administración oral de los VHH previamente discutido. En primer lugar, es importante señalar que no fue posible cuantificar la cantidad de VHH que expresaban en leche las ratonas empleadas en esta experiencia. Esto se debió a la imposibilidad de obtener muestras de leche por ordeño dado que no se contaba con un dispositivo mecánico de extracción y los resultados del ordeño manual no fueron exitosos. De esta forma, no fue posible cuantificar en forma directa la cantidad de VHH expresado y administrado a los lactantes ni el perfil de expresión de los VHH durante las distintas fases de la lactancia. Sin embargo, los análisis previos de muestras de otros ejemplares de ratonas transgénicas evidenciaron bajos títulos de nanoanticuerpos lo que podría explicar la menor eficiencia observada. Por otra parte, se observó que las camadas de ratones transgénicos eran menos numerosas y presentaban mayor mortalidad en comparación con los *wild type*. La disminución de la capacidad reproductiva de animales transgénicos que sobreexpresan proteínas exógenas ha sido discutida previamente [166] y es una problemática a tener en cuenta al utilizar esta estrategia.

La experiencia de *cross-fostering* realizada para descartar el posible efecto de la transgénesis en sí misma sobre la evolución de la infección por RVA, arrojó resultados contradictorios. Por un lado, los resultados obtenidos en relación a la prevalencia de diarrea severa fueron los esperados de acuerdo al objetivo del experimento. Es decir que en los grupo de ratones amamantados por madres transgénicas que expresaban los nanoanticuerpos 2KD1+3B2 en la leche materna se redujo más rápidamente el porcentaje de ratones afectados que aquellos ratones transgénicos que fueron alimentados con leche *wild type*. Sin embargo, al analizar las muestras de tejido intestinal y materia fecal, no se observó la correspondencia esperada entre una menor prevalencia de diarrea y menores títulos infecciosos en el tejido intestinal o menor excreción fecal. Los ratones *wild type* alimentados por madres transgénicas mostraron mayores títulos infecciosos en tejido intestinal y mayor excreción de RVA en heces que los ratones transgénicos amamantados

por madres *wild type*. Las discordancias observadas podrían deberse a una expresión inconstante de los VHH durante la lactancia. El *cross-fostering* de las crías fue realizado durante los primeros días de vida. Esto implica que ambos grupos de ratones calostraron con sus madres originales y no con las sustitutas. Si la expresión de los nanoanticuerpos hubiera sido superior en el calostro respecto de la leche, esta administración temprana de una dosis alta de VHH podría haber retrasado el inicio del cuadro clínico, mostrando menor prevalencia de lactantes con diarrea severa hacia el inicio de la experiencia. Una vez intercambiadas las crías, los niveles de expresión de VHH en la leche de las ratonas transgénicas podría no ser suficiente para prevenir o dificultar el desarrollo posterior de la infección viral. El promotor utilizado para la regulación de la construcción génica también podría jugar un rol en las discordancias observadas. Efectivamente, no se utilizó un promotor de proteínas lácteas murinas sino el promotor del Virus de Tumor Mamario Murino. Si bien este promotor regula la expresión de los genes virales en glándula mamaria de las ratonas afectadas, podría no presentar el mismo rendimiento que otros promotores específicos de proteínas lácteas murinas como lactalbúmina [167] o la proteína ácida del suero de la leche (*acid whey protein*) [168]. Futuros estudios que involucren esta estrategia deberían evaluar el uso de nuevas ratonas transgénicas en las cuales el transgen esté regulado bajo promotores específicos de proteínas lácteas murinas de forma tal de aumentar el rendimiento de la expresión.

Más allá de las limitaciones observadas, el modelo de expresión de los VHH anti-VP6 en leche de ratonas transgénicas presentó resultados promisorios en el esquema de lactancia tradicional (sin intercambio de crías). En términos generales para este modelo, el bajo rendimiento de la leche murina restringe la expresión de las proteínas recombinantes a cantidades del orden de los miligramos [169]. Sin embargo, la expresión en ratones representa un primer paso. La potencial capacidad productiva de los animales transgénicos es extraordinaria y cada animal es efectivamente una planta de producción producto-específica [170]. Los animales transgénicos con transgenes específicos asociados a la lactancia, se han convertido en una opción atractiva para la producción de grandes volúmenes de productos terapéuticos para la industria farmacéutica en conejos [171], cerdos [172], cabras [173] y vacas [174]. En el caso de 2KD1 y 3B2, uno de los objetivos planteados en el proyecto FONARSEC INTABIO AF 03-2010 fue desarrollar bovinos transgénicos que expresaran los VHH anti-VP6 en su leche, en colaboración con una empresa biofarmacéutica nacional, como había sido realizado previamente para otra molécula [174]. En un futuro inmediato se espera contar con bovinos transgénicos que

expresen cantidades óptimas de VHH anti-RVA en glándula mamaria lo que daría origen a una leche funcional con capacidad antiviral.

Una de las principales dificultades que atraviesa cualquier tratamiento oral contra RVA es la posible degradación de las moléculas empleadas por la acción de las enzimas del tracto digestivo. Si los VHH anti-VP6 sufriesen una digestión durante su paso por el estómago o el duodeno, la dosis efectiva liberada en el intestino delgado sería sustancialmente menor a la administrada. La incubación de cada clon de VHH en FGS comprobó las preocupaciones previas. Efectivamente, ambos clones de nanoanticuerpos fueron degradados casi por completo luego de una hora de exposición en ausencia de excipientes a la pepsina gástrica. Es importante remarcar que la incubación con FGS a pH=2 sin pepsina no afectó a los VHH, en coincidencia con estudios previos que señalaban la resistencia de los mismos a condiciones extremas de pH. Por otra parte, la incubación de ambos clones de VHH en FIS en ausencia de excipientes no evidenció una degradación significativa de ninguno de ellos. Los resultados obtenidos demostrarían, entonces, que el paso por el estómago y la acción de las enzimas gástricas constituye el paso crítico para una correcta liberación intestinal del tratamiento.

Con el objetivo de disminuir la acción de la pepsina sobre los VHH, se evaluó La incubación de los mismos con una serie de excipientes (SRO, albúmina bovina, caseína, maltodextrina). De todas las sustancias probadas, sólo las SRO lograron disminuir la degradación enzimática, probablemente por la elevación del pH del medio, dificultando así la acción de la pepsina. Efectivamente, en presencia de SRO ambos clones presentaron una funcionalidad remanente cercana a los valores obtenidos en ausencia de enzimas. Las SRO son administradas en forma rutinaria a pacientes pediátricos afectados con RVA, como ya fuera mencionado previamente, con el objetivo de disminuir el riesgo de muerte por deshidratación, especialmente en los casos más graves. La administración oral conjunta de las SRO junto a VHH anti-VP6 permitiría un sinergismo entre ambas terapias. Por un lado, los VHH aportarían una acción neutralizante específica contra RVA disminuyendo la duración y la severidad de los síntomas. Las SRO, por su parte, mejorarían el balance de electrolitos previniendo la deshidratación severa y la degradación de los nanoanticuerpos en su paso por el tracto digestivo.

Continuando con los estudios de caracterización de los VHH anti-VP6, se evaluó la resistencia térmica de ambos clones en distintas condiciones. En primer lugar, los VHH fueron incubados a temperaturas crecientes en un rango de 37°C a 100°C. Tanto 2KD1 como 3B2 mostraron una funcionalidad remanente semejante a la inicial al ser incubados

durante 1 minuto hasta a 100°C, comprobando que los nanoanticuerpos VHH poseen una resistencia térmica mayor que los anticuerpos monoclonales tradicionales [132]. En segundo lugar, en el marco del proyecto FONARSEC "Desarrollo de Alimentos funcionales en base a nanoanticuerpos expresados en leche de bovinos transgénicos para prevenir la diarrea por Rotavirus", se evaluó la resistencia de los VHH disueltos en leche bovina comercial a dos procesos empleados en la producción láctea. El propósito de este proyecto es la generación de un alimento lácteo funcional enriquecido en VHH anti-VP6 que pueda ser administrado oralmente a pacientes pediátricos para la prevención y el tratamiento de la diarrea asociada a RVA. Estudios previos de resistencia proteolítica habían evidenciado que la resistencia de los VHH a la acción de las enzimas gástricas aumentaba notablemente si estaban disueltos en leche. Ambos clones mantuvieron una elevada funcionalidad luego de ambos tratamientos, comprobando lo hallado en los estudios anteriores. Finalmente, con el propósito de evaluar la posible utilización y almacenamiento de los VHH en forma de polvo, ambos clones fueron resuspendidos en SRO y sometidos al proceso de liofilización. Tanto 2KD1 como 3B2 mantuvieron casi intacta su funcionalidad para reconocer y neutralizar partículas de RVA. De esta forma, los VHH junto con las SRO podrían ser resuspendidos en agua potable previamente a su administración oral. Este esquema eliminaría la necesidad de mantener la cadena de frío para la conservación del producto, lo cual resulta prioritario para la utilización de esta terapia en zonas de bajos recursos.

A lo largo de este trabajo, se realizaron numerosas búsquedas bibliográficas referidas a la prevención y el tratamiento de la diarrea asociada a RVA. Como se mencionó previamente, existen múltiples estrategias actualmente disponibles, aunque ninguna de ellas ha sido recomendada para su uso rutinario en pacientes pediátricos afectados. La utilización de diferentes hierbas y compuestos vegetales para el tratamiento de la diarrea, los cólicos y los dolores abdominales presenta una amplia distribución mundial [110,117,175]. En nuestro país existen numerosas hierbas que se usan tradicionalmente en la medicina folclórica para el tratamiento de afecciones digestivas, principalmente en forma de infusiones. Sin embargo, existen pocos trabajos que aborden el estudio de estos saberes populares desde el laboratorio. Puente del Sur es una red de economía solidaria que comercializa productos producidos por comunidades campesinas, pueblos originarios y movimientos sociales. Entre otros, la red comercializa y difunde algunos productos de la comunidad campesina Las Tomasas, situada en la Provincia de Mendoza, Argentina. Dicho emprendimiento productivo está formada intrínsecamente por

mujeres campesinas de la zona que se organizaron para aumentar la producción de frutas confitadas, especias y hierbas aromáticas con diversos usos medicinales. Entre las hierbas aromáticas que se producen se destacan *Aloysia citrodora*, conocida popularmente como cedrón y *Piper aduncum*, conocido popularmente como mático. Ambas hierbas son utilizadas dentro de la comunidad en forma de infusión para el tratamiento de diferentes síntomas asociados afecciones digestivas: diarrea, disentería, dolores abdominales.

Uno de los objetivos de este trabajo fue, entonces, evaluar la actividad anti-RVA de ambas hierbas aromáticas tanto *in vitro* como *in vivo*. Los estudios de neutralización viral *in vitro* evidenciaron que tanto *A. citrodora* como *P. aduncum* presentaban actividad contra una cepa humana Wa de RVA. A partir de estos hallazgos, ambas hierbas fueron evaluadas para el tratamiento terapéutico pre-sintomático en el modelo de ratón lactante, administrándose por sonda intragástrica en forma de infusiones. La administración oral de ambas infusiones provocó un retraso en el desarrollo del cuadro clínico, disminuyendo significativamente la duración y la severidad de la diarrea. Si bien hubo, una tendencia a la reducción de la infección intestinal y la excreción viral en heces, la misma no fue significativa estadísticamente. Los resultados alcanzados muestran que ambas hierbas aromáticas logran mitigar la diarrea por RVA, uno de los principales agentes etiológicos de las diarreas infantiles. En este sentido, los ensayos realizados aportan evidencia científica a los saberes populares comprobados ancestralmente en las comunidades campesinas de nuestro país. El hecho de que las dos infusiones hayan logrado reducir la duración y severidad de los síntomas pero no disminuir significativamente la infección intestinal y la excreción viral en heces, podría explicarse por una acción antiviral no neutralizante de las partículas de RVA. Futuros estudios sobre este tema deberán abordar en forma más detallada los mecanismos biológicos subyacentes para la actividad antidiarreica de *A. citrodora* y *P. aduncum* frente a RVA.

Los resultados obtenidos en el modelo de ratón lactante mostraron que los VHH anti-VP6 evaluados lograban disminuir la sintomatología y la excreción viral. Sin embargo, para establecer si la terapia basada en estos nanoanticuerpos constituye un avance en el tratamiento de la diarrea asociada a RVA resultaba necesario realizar un ensayo comparativo con otras opciones terapéuticas actualmente disponibles. Por un lado, se evaluó la acción de infusiones de *A. citrodora* y *P. aduncum* como fuera descrito previamente. Por otra parte, se realizó un nuevo ensayo en el modelo ratón (BALB/c) lactante en el que se evaluaron dos dosis de VHH anti-VP6 disueltas en SRO para

evaluar si la adición de las sales mejoraba la eficiencia de los nanoanticuerpos, en base a los estudios de resistencia proteolítica *in vitro*. Por otra parte, se evaluaron dos drogas sintéticas empleadas en el tratamiento de la diarrea: nitazoxanida y Crema de Bismuto.

Los resultados obtenidos para la administración oral de VHH anti-VP6 en SRO fueron similares a los obtenidos previamente sin la adición de sales. Efectivamente, ambas dosis (2KD1+3B2: 50mg/kg, 2KD1: 50mg/kg) lograron reducir la duración y la severidad de la diarrea así como también la infección intestinal y la excreción viral. Sin embargo, la eficacia de la dosis combinada de ambos clones en presencia de las SRO mejoró respecto de la dosis probada anteriormente en ausencia de sales, lo que reforzaría las ventajas de administrar los VHH en conjunto. Mientras que la administración oral de Crema de Bismuto logró reducir significativamente la duración de la diarrea aunque en menor magnitud que los VHH o las infusiones de hierbas aromáticas, no logró modificar los parámetros de infección intestinal y excreción viral fecal. Estos resultados sugerirían que la acción de la Crema de Bismuto frente a la diarrea por RVA se circunscribe a sus propiedades antisecretorias y absortivas a nivel intestinal, sin tener un efecto sobre las partículas de RVA. De comprobarse esta aseveración, su utilización en pacientes pediátricos afectados con RVA podría resultar controversial dado que disminuiría los síntomas sin afectar el curso de la infección viral. La dosis de nitazoxanida administrada, por su parte, no modificó la duración ni la severidad de la diarrea pero sí disminuyó significativamente la infección intestinal y la excreción viral. Los resultados obtenidos podrían indicar que, a diferencia de la Crema de Bismuto, la nitazoxanida presentaría acción específica contra RVA pero no sería capaz de resolver el cuadro clínico una vez que RVA genera una disrupción de la homeostasis intestinal.

El estudio comparativo de la eficacia terapéutica de los VHH anti-VP6 con drogas sintéticas e infusiones de hierbas aromáticas con propiedades antidiarreicas confirmaría que la administración oral de los nanoanticuerpos implicaría una mejora en el tratamiento actual de la diarrea por RVA. Mientras las otras terapias actuaban sobre los síntomas o sobre la infección y excreción viral en forma excluyente, los VHH lograban reducir la duración de la diarrea a la vez que neutralizaban las partículas virales infecciosas en intestino y, subsecuentemente, la excreción fecal de las mismas. Los resultados obtenidos confirmarían la importancia de contar con un tratamiento específico contra RVA, en contraposición con opciones terapéuticas inespecíficas que no logran abordar un tratamiento de conjunto frente a la patología.

Los resultados alcanzados en este trabajo comprueban que la administración oral de VHH anti-VP6 constituiría una opción profiláctica y terapéutica efectiva contra la diarrea asociada a RVA dado que logró disminuir la duración y la severidad de la diarrea, el título infeccioso en el intestino y la excreción viral. Por otra parte, la mitigación del cuadro clínico no impidió el desarrollo de una respuesta inmune humoral del hospedador contra el patógeno, contribuyendo a que las subsiguientes infecciones se presenten con menor intensidad. La administración oral de los nanoanticuerpos constituye un tratamiento seguro en términos de su baja inmunogenicidad y la baja probabilidad de generación de mutantes virales de escape debido a que la proteína VP6 se encuentra altamente conservada entre las distintas cepas de RVA. Si bien el clon 2KD1 obtuvo resultados más promisorios que el clon 3B2, la mezcla de ambos en presencia de SRO también mostró elevada eficacia. Restaría realizar nuevos estudios que aborden la caracterización de los epítopes neutralizantes de cada uno de los clones y la posible competencia entre los mismos. Por otra parte, la resistencia de los VHH a procesos térmicos implica que los VHH podrían ser utilizados en forma de polvo liofilizado junto con SRO lo que constituiría una estrategia favorable para su implementación en áreas de bajos recursos donde las cadenas de frío son difíciles de mantener. La acción específica de los VHH anti-VP6 contra RVA permite que los nanoanticuerpos actúen tanto sobre la sintomatología diarreica como también sobre la infección y la excreción viral, algo que no ocurre con otras opciones terapéuticas disponibles en la actualidad. En definitiva, la administración oral de 2KD1 o 2KD1+3B2 representaría una herramienta profiláctica complementaria a la vacunación en aquellas poblaciones que presentar menor eficiencia de inmunización. A nivel terapéutico, constituiría un avance respecto a las restantes opciones terapéuticas actualmente vigentes, incluso luego de la aparición de los primeros síntomas de diarrea.

REFERENCIAS

1. Liu L, Oza S, Hogan D, Perin J, Rudan I, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet*. Elsevier Ltd; 2015;385: 430–440. doi:10.1016/S0140-6736(14)61698-6
2. Liu L, Oza S, Hogan D, Perin J, Rudan I, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet*. Elsevier Ltd; 2015;385: 430–440. doi:10.1016/S0140-6736(14)61698-6
3. Tate J, Burton AH, Boschi-Pinto C, Duncan Steele A, Duque J, Parashar UD. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2008;12: 136–41.
4. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One*. 2013;8: e72788. doi:10.1371/journal.pone.0072788
5. Parashar U, Nelson E. Diagnosis , management , and prevention of rotavirus gastroenteritis in children. *Bmj*. 2013;347: 1–10. doi:10.1136/bmj.f7204
6. Degiuseppe JI, Reale EA, Stupka JA. Rotavirus epidemiology and surveillance before vaccine introduction in Argentina, 2012-2014. *J Med Virol*. 2016; 2012–2014. doi:10.1002/jmv.24650
7. Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. *Gastroenterology*. 2009;136: 1939–1951. doi:10.1053/j.gastro.2009.02.076
8. Dennehy PH. Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19: S103-5. doi:10.1097/00006454-200010001-00003
9. Graham DY, Dufour GR, Estes MK. Minimal infective dose of rotavirus. *Arch Virol*. 1987;92: 261–271. doi:10.1007/BF01317483
10. Turcios RM, Curns AT, Holman RC, Pandya-Smith I, LaMonte A, Bresee JS, et al. Temporal and Geographic Trends of Rotavirus Activity in the United States, 2004. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25: 451–454. doi:10.1097/01.inf.0000214987.67522.78
11. Anderson EJ, Weber SG. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis*. 2004;4: 91–99.
12. Franco MA, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for

- rotavirus vaccines. *Vaccine*. 2006;24: 2718–2731.
doi:10.1016/j.vaccine.2005.12.048
13. Ramig RF. Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection
MINIREVIEW Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *J Virol*.
2004;78: 10213–20. doi:10.1128/JVI.78.19.10213
 14. Estes MK. Rotavirus and their replication. In: Fields DMKBN, Howley PM, editors.
Field's Virology. Philadelphia: Lippincott - Raven; 2001. pp. 1347–1353.
 15. Lundgren O, Svensson L. Pathogenesis of Rotavirus diarrhea. *Microbes Infect*.
2001;3: 1145–1156. doi:10.1016/S1286-4579(01)01475-7
 16. Li Z, Baker ML, Jiang W, Estes MK, Prasad BV V. Rotavirus Architecture at
Subnanometer Resolution. *J Virol*. 2009;83: 1754–1766. doi:10.1128/JVI.01855-08
 17. Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus Serotypes: Classification and Importance in
Epidemiology, Immunity, and Vaccine Development. *J Heal Popul Nutr*. 2000;18: 5–
14.
 18. Ball LA. The universal taxonomy of viruses in theory and practice. In: Fauquet C,
Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, editors. *Virus Taxonomy: Eight Report of the
International Committee on taxonomy of Viruses*. Amsterdam, Holland: Elsevier,
Academic Press; 2005. p. 3–8.
 19. Suzuki T, Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Analysis of genetic divergence
among strains of porcine rotavirus C, with focus on VP4 and VP7 genotypes in
Japan. *Virus Res*. Elsevier B.V.; 2015;197: 26–34.
doi:10.1016/j.virusres.2014.12.002
 20. Suzuki T, Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Phylogenetic characterization of
VP6 gene (inner capsid) of porcine rotavirus C collected in Japan. *Infect Genet
Evol*. Elsevier B.V.; 2014;26: 223–227. doi:10.1016/j.meegid.2014.05.024
 21. Marthaler D, Rossow K, Culhane M, Collins J, Goyal S, Ciarlet M, et al.
Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus
VP7 sequences from the United States and Canada. *Virology*. Elsevier; 2013;446:
189–198. doi:10.1016/j.virol.2013.08.001
 22. Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Estes MK, Gentsch JR, et al.
Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all genomic
RNA segments. *Arch Virol*. 2008;153: 1621–1629. doi:10.1007/s00705-008-0155-
1.Recommendations
 23. Rotavirus Classification Working Group: RCWG [Internet]. Available:

<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>

24. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*. 2005;15: 29–56. doi:10.1002/rmv.448
25. Bányai K, László B, Duque J, Steele a. D, Nelson EAS, Gentsch JR, et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*. 2012;30: 122–130. doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.111
26. Kar S, Pattnaik D, Das SC, Pharveen I. Prospective hospital-based surveillance to estimate the burden of rotavirus gastroenteritis in children less than five years in Bhubaneswar. *Clin Epidemiol Glob Heal*. Elsevier Ltd; 2014;2: 52–55. doi:10.1016/j.cegh.2014.03.001
27. Sherchand J, Tandukar S, Sherchan J, Gurung S, Dhakwa J, Bichha R, et al. Molecular epidemiology of Rotavirus diarrhea among children in Nepal : Emergence of G12 and G9 strains. *J Inst Med*. 2013;4: 3–10.
28. Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol*. 2008;82: 3204–3219. doi:10.1128/JVI.02257-07
29. Ruiz MC, Cohen J, Michelangeli F. Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium*. 2000;28: 137–49. doi:10.1054/ceca.2000.0142
30. Ramig R. Systemic rotavirus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5: 591–612. doi:10.1586/14787210.5.4.591
31. Fenaux M, Cuadras M a, Feng N, Jaimes M, Greenberg HB. Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice. *J Virol*. 2006;80: 5219–5232. doi:10.1128/JVI.02664-05
32. Adams W, Kraft L. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science (80-)*. 1963;141: 359–360. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
33. Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris a P, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*. 1996. doi:10.1126/science.272.5258.101
34. Johansen K, Hinkula J, Espinoza F, Levi M, Zeng C, Rudén U, et al. Humoral and

- cell-mediated immune responses in humans to the NSP4 enterotoxin of rotavirus. *J Med Virol.* 1999;59: 369–377. doi:10.1002/(SICI)1096-9071(199911)59:3<369::AID-JMV18>3.0.CO;2-N
35. Lundgren O, Peregrin A, Persson K, Kordasti S, Uhnöo I, Svensson L. Role of the Enteric Nervous System in the Fluid and Electrolyte Secretion of Rotavirus Diarrhea. *Science.* 2000.
 36. Velazquez FR, Matson D, Calva J, Guerrero M, Morrow A, Carter-Campbell S, et al. ROTAVIRUS INFECTION IN INFANTS AS PROTECTION AGAINST SUBSEQUENT INFECTIONS. *N Engl J Med.* 1996;335: 1022–1028. Available: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199610033351404>
 37. Youngman KR, Franco M a, Kuklin N a, Rott LS, Butcher EC, Greenberg HB. Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response. *J Immunol.* 2002;168: 2173–2181. doi:10.4049/jimmunol.168.5.2173
 38. Bouvet J, Fischetti V a, Barrier M. Diversity of Antibody-Mediated Immunity at the Mucosal Barrier MINIREVIEW Diversity of Antibody-Mediated Immunity at the. 1999;67: 2687–2691.
 39. Cheever F, Mueller J. Epidemic Diarrheal Disease of Suckling Mice. *J Exp Med.* 1946;85: 405–416.
 40. Kraft L. Observations on the control and natural history of epidemic diarrhea of infant mice (EDIM). *Yale J Biol Med.* 1958;31: 123–37.
 41. Kraft L. Studies on the etiology and transmission of epidemic diarrhea of infant mice. *J Exp Med.* 1957;101: 743–755.
 42. Wilsnack R, Blackwell J, Parker J. Identification of an agent of epizootic diarrhea of infant mice by immunofluorescent and complement-fixation tests. *Am J Vet Res.* 1969;30: 1195–1204.
 43. Burns J, Krishnaney A, Vo P, Rouse R, Anderson L, Greenberg H. Analyses of homologous Rotavirus infection in the mouse model. *Virology.* 1995;207: 143–53.
 44. Feng N, Yasukawa LL, Sen A, Greenberg HB. Permissive replication of homologous murine rotavirus in the mouse intestine is primarily regulated by VP4 and NSP1. *J Virol.* 2013;87: 8307–16. doi:10.1128/JVI.00619-13
 45. Greenberg HB, Vo PT, Jones R. Cultivation and characterization of three strains of murine rotavirus. *J Virol.* 1986;57: 585–90. Available:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=252773&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

46. Maffey L, Vega C, Parreño V, Garaicoechea L. Controlling Rotavirus-associated diarrhea: could Single-domain antibody fragments make the difference? *Rev Argent Microbiol.* 2015;47: 368–379.
47. Little L, Shadduck J. Pathogenesis of Rotavirus Infection in Mice. *Infect Immun.* 1982;38: 755–763.
48. Boshuizen J a, Reimerink JHJ, Korteland-van Male AM, van Ham VJJ, Koopmans MPG, Buller H a, et al. Changes in Small Intestinal Homeostasis, Morphology, and Gene Expression during Rotavirus Infection of Infant Mice. *J Virol.* 2003;77: 13005–13016. doi:10.1128/JVI.77.24.13005
49. Bell L, Clark H, O'Brien E, Kornstein M, Plotkin S, Offit P. Gastroenteritis caused by human Rotaviruses (Serotype three) in a suckling mouse model. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1987;184: 127–132. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
50. Osborne M, SJ H, KJ W, Spencer A, Starkey W, Thornber D, et al. Rotavirus-Induced changes in the microcirculation of intestinal villi of neonatal mice in relation to the induction and persistence of diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1991;12: 111–120.
51. Horie Y, Nakagomi O, Koshimura Y, Nakagomi T, Suzuki Y, Oka T, et al. Diarrhea induction by rotavirus NSP4 in the homologous mouse model system. *Virology.* 1999;262: 398–407. doi:10.1006/viro.1999.9912
52. Tsugawa T, Tatsumi M, Tsutsumi H. Virulence-associated genome mutations of murine rotavirus identified by alternating serial passages in mice and cell cultures. *J Virol.* 2014;88: 5543–58. doi:10.1128/JVI.00041-14
53. Moulton LH, Staat M a, Santosham M, Ward RL. The protective effectiveness of natural rotavirus infection in an American Indian population. *J Infect Dis.* 1998;178: 1562–6. doi:10.1086/314504
54. O'Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. *J Infect Dis.* 1994;169: 504–11. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8158022>
55. Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow a L, Carter-Campbell S, et al. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 1996;335: 1022–1028. doi:10.1056/NEJM199610033351404
56. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, et

- al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med*. 2006;354: 23–33. doi:10.1056/NEJMoa052664
57. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Intussusception among recipients of rotavirus vaccine--United States, 1998-1999. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Rep*. 1999;48: 577.
58. Ciarlet M, Schödel F. Development of a rotavirus vaccine: clinical safety, immunogenicity, and efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq. *Vaccine*. 2009;27 Suppl 6: G72-81. doi:10.1016/j.vaccine.2009.09.107
59. Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med*. 2006;354: 11–22. doi:10.1056/NEJMoa052434
60. Vesikari T, Karvonen A, Puustinen L, Zeng S-Q, Szakal ED, Delem A, et al. "Efficacy of RIX4414 live attenuated human rotavirus, vaccine in Finnish infants." *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23: 937–43.
61. do Carmo GMI, Yen C, Cortes J, Siqueira AA, de Oliveira WK, Cortez-Escalante JJ, et al. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS Med*. 2011;8: e1001024. doi:10.1371/journal.pmed.1001024
62. Armah GE, Sow SO, Breiman RF, Dallas MJ, Tapia MD, Feikin DR, et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2010;376: 606–14. doi:10.1016/S0140-6736(10)60889-6
63. Dennehy PH. Treatment and prevention of rotavirus infection in children. *Curr Infect Dis Rep*. 2013;15: 242–50. doi:10.1007/s11908-013-0333-5
64. Jiang V, Jiang B, Tate J, Parashar UD, Patel MM. Performance of rotavirus vaccines in developed and developing countries. *Hum Vaccin*. 2010;6: 532–42. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3322519&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
65. Babji S, Kang G. Rotavirus vaccination in developing countries. *Curr Opin Virol*. Elsevier B.V.; 2012;2: 443–8. doi:10.1016/j.coviro.2012.05.005
66. Moon S-S, Groome MJ, Velasquez DE, Parashar UD, Jones S, Koen A, et al. Prevacination Rotavirus Serum IgG and IgA Are Associated With Lower Immunogenicity of Live, Oral Human Rotavirus Vaccine in South African Infants.

- Clin Infect Dis. 2015; civ828. doi:10.1093/cid/civ828
67. Kandasamy S, Chattha KS, Vlasova AN, Saif LJ. Prenatal vitamin A deficiency impairs adaptive immune responses to pentavalent rotavirus vaccine (RotaTeq®) in a neonatal gnotobiotic pig model. *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2014;32: 816–824. doi:10.1016/j.vaccine.2013.12.039
 68. Vlasova AN, Chattha KS, Kandasamy S, Siegismund CS, Saif LJ. Prenatally acquired vitamin A deficiency alters innate immune responses to human rotavirus in a gnotobiotic pig model. *J Immunol*. 2013;190: 4742–53. doi:10.4049/jimmunol.1203575
 69. Patel N, Hertel P, Estes M, de la Morena M, Petru A, Noroski L, et al. Vaccine-Acquired Rotavirus in Infants with Severe Combined Immunodeficiency. *New Engl J Med*. 2010;362: 314–19.
 70. World Health Organization. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. 2009.
 71. Böhles, N, Busch, K and Hensel M. Vaccines against human diarrheal pathogens: Current status and perspectives. *Hum Vaccines Immunother*. 2014;10: 1522–35.
 72. WHO- UNICEF, Johns Hopkins School of Public Health U. Implementing the New Recommendations on the Clinical Management of Diarrhoea Guidelines for Policy Makers and Programme Managers. World Health Organization, Department of Child and Adolescent Health and Development, and United Nations Children’s Fund, Programme Division; 2006.
 73. Dennehy PH. Treatment and prevention of rotavirus infection in children. *Curr Infect Dis Rep*. 2013;15: 242–250. doi:10.1007/s11908-013-0333-5
 74. Faure C. Role of antidiarrhoeal drugs as adjunctive therapies for acute diarrhoea in children. *Int J Pediatr*. 2013;2013: 612403. doi:10.1155/2013/612403
 75. Anderson VR, Curran MP. Nitazoxanide Gastrointestinal Infections. *Drugs*. 2007;67: 1947–1967.
 76. Rossignol JF, Abu-Zekry M, Hussein A, Santoro MG. Effect of nitazoxanide for treatment of severe rotavirus diarrhoea: randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet*. 2006;368: 124–129. doi:10.1016/S0140-6736(06)68852-1
 77. Teran CG, Teran-Escalera CN, Villarroel P. Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. *Int J Infect Dis*. 2009;13: 518–23. doi:10.1016/j.ijid.2008.09.014

78. Centers for Disease Control and Prevention. Managing acute gastroenteritis among children: oral rehydration, maintenance, and nutritional therapy. *Pediatrics*. 2004;114: 507–507.
79. Salazar-Lindo E, Santisteban-Ponce J, Chea-Wood E, Gutiérrez M. Racecadotril in the treatment of acute watery diarrhea in children. *New Engl J Med*. 2000;343: 463–67.
80. Lehert P, Chéron G, Calatayud GA, Cézard JP, Castrellón PG, Garcia JMM, et al. Racecadotril for childhood gastroenteritis: An individual patient data meta-analysis. *Dig Liver Dis. Editrice Gastroenterologica Italiana*; 2011;43: 707–713. doi:10.1016/j.dld.2011.03.001
81. Szajewska H, Ruszczyński M, Chmielewska a, Wiczorek J. Systematic review: racecadotril in the treatment of acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26: 807–813. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03444.x
82. DuPont HL, Flores Sanchez J, Ericsson CD, Mendiola Gomez J, DuPont MW, Cruz Luna a, et al. Comparative efficacy of loperamide hydrochloride and bismuth subsalicylate in the management of acute diarrhea. *Am J Med*. 1990;88: 15S–19S.
83. Soriano-Brucher H, Avendano P, O’Ryan M, Braun SD, Manhart MD, Balm TK, et al. Bismuth subsalicylate in the treatment of acute diarrhea in children: a clinical study. *Pediatrics*. 1991;87: 18–27.
84. Szajewska H, Gieruszczak-Bia ek D, Dylag M. Meta-analysis: Ondansetron for vomiting in acute gastroenteritis in children. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;25: 393–400. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.03231.x
85. Guandalini S. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45: S149–S153. doi:10.1097/MCG.0b013e3182257e98
86. Guarino A, Lo Vecchio A, Canani RB. Probiotics as prevention and treatment for diarrhea. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009;25: 18–23. doi:10.1097/MOG.0b013e32831b4455
87. Grandy G, Medina M, Soria R, Terán CG, Araya M. Probiotics in the treatment of acute rotavirus diarrhoea. A randomized, double-blind, controlled trial using two different probiotic preparations in Bolivian children. *BMC Infect Dis*. 2010;10: 253. doi:10.1186/1471-2334-10-253
88. Billoo AG, Memon MA, Khaskheli SA, Murtaza G, Iqbal K, Shekhani MS, et al. Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhoea. 2006;12: 4557–60.

89. Sarker SA, Sultana S, Fuchs GJ, Alam NH, Azim T, Brüssow H, et al. *Lactobacillus paracasei* strain ST11 has no effect on rotavirus but ameliorates the outcome of nonrotavirus diarrhea in children from Bangladesh. *Pediatrics*. 2005;116: e221–e228. doi:10.1542/peds.2004-2334
90. Maffey L, Vega CG, Miño S, Garaicoechea L, Parreño V. Anti-VP6 VHH: An Experimental Treatment for Rotavirus A-Associated Disease. *PLoS One*. 2016;11: e0162351. doi:10.1371/journal.pone.0162351
91. Sarker SA, Casswall TH, Mahalanabis D, Alam N, Albert M, Brüssow H, et al. Successful treatment of rotavirus diarrhea in children with immunoglobulin from immunized bovine colostrum. *Pediatr Infect Dis J*. 1998;17: 49–54.
92. Burns JW, Siadat-pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective Effect of Rotavirus VP6-Specific IgA Monoclonal Antibodies That Lack Neutralizing Activity. *Science* (80-). 1996;272: 104–7.
93. Sarker SA, Casswall TH, Juneja LR, Hoq E, Hossain I, Fuchs GJ, et al. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001;32: 19–25. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11176319>
94. Sarker SA, Pant N, Juneja LR, Hammarström L. Successful Treatment of Rotavirus-induced Diarrhoea in Suckling Mice with Egg Yolk Immunoglobulin. *J Heal Popul Nutr*. 2007;25: 465–68.
95. Vega CG, Bok M, Vlasova AN, Chattha KS, Fernández FM, Wigdorovitz A, et al. IgY antibodies protect against human Rotavirus induced diarrhea in the neonatal gnotobiotic piglet disease model. *PLoS One*. 2012;7: e42788. doi:10.1371/journal.pone.0042788
96. Inagaki M, Yamamoto M, Uchida K, Yamaguchi H, Kawasaki M, Yamashita K, et al. In Vitro and in Vivo Evaluation of the Efficacy of Bovine Colostrum against Human Rotavirus Infection. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74: 680–682. doi:10.1271/bbb.90862
97. Mine Y, Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J Med Food*. 2002;5: 159–169. doi:10.1089/10966200260398198
98. Vega C, Bok M, Chacana P, Saif L, Fernandez F, Parreño V. Egg yolk IgY: protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. *Vet Immunol Immunopathol*.

- 2011;142: 156–69. doi:10.1016/j.vetimm.2011.05.003
99. Mrukowicz J, Szajewska H, Vesikari T, Mrukowicz AJ. Options for the prevention of rotavirus disease other than vaccination. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;46 Suppl 2: S32–S37. doi:10.1097/MPG.0b013e31816f79b0
 100. Offit PA, Shaw RD, Greenberg HB. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins vp3 and vp7. *J Virol.* 1986;58: 700–703.
 101. Matsui S, Offit P, Vo P, Mackow E, Benfield D, Shaw RD, et al. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to the heterotypic neutralization domain of VP7 and the VP8 fragment of VP4. *J Clin Microbiol.* 1989;27: 780–782.
 102. Daugherty AL, Mrsny RJ. Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58: 686–706. doi:10.1016/j.addr.2006.03.011
 103. Reilly R, Domingol R, Sandhu J. Oral Delivery of Antibodies Future Pharmacokinetic Trends. *Clin Pharmacokinet.* 1997;32: 313–323.
 104. Gilani A, Rahman A. Trends in ethnopharmacology. *J Ethnopharmacol.* 2005;100: 43–49. doi:10.1016/j.jep.2005.06.001
 105. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Pure Appl chemistry.* 2013;77: 7–24. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008
 106. Uprety Y, Asselin H, Dhakal A, Julien N. Traditional use of medicinal plants in the boreal forest of Canada: review and perspectives. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2012;8: 7. doi:10.1186/1746-4269-8-7
 107. Scarpa GF. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. *J Ethnopharmacol.* 2004;91: 115–35. doi:10.1016/j.jep.2003.12.003
 108. Dillinger TL, Barriga P, Escá S, Jimenez M, Lowe DS, Grivetti LE. Chocolate: Modern Science Investigates an Ancient Medicine Food of the Gods: Cure for Humanity? A Cultural History of the Medicinal and Ritual Use of Chocolate 1. *J Nutr.* 2057;130: 2057–2072.
 109. Lakshminarayana M, Shivkumar H, Rimaben P, Bhargava VK. Antidiarrhoeal activity of leaf extract of *Moringa Oleifera* in experimentally induced diarrhoea in rats. *Int J Phytomedicine.* 2011;3: 68–74.
 110. Rahman T, Rahman KA, Rajia S, Alamgir M, Khan MTH, Choudhuri MSK. Evaluation of antidiarrhoeal activity of Cardamom (*Elettaria cardamomum*) on mice

- models. *Orient Pharm Exp Med*. 2008;8: 130–134. doi:10.3742/OPEM.2008.8.2.130
111. Bruins MJ, Cermak R, Kiers JL, Meulen J Van Der, Amelsvoort JMM Van, Klinken BJW Van. In Vivo and In Vitro Effects of Tea Extracts on Enterotoxigenic *Escherichia coli* Y-induced Intestinal Fluid Loss in Animal Models. 2006;
 112. Ashraful Alam M, Akter R, Subhan N, Mostafizur Rahman M, Majumder M, Nahar L, et al. Article flowering tops of *Anthocephalus cadamba*. *Brazilian J Pharmacogn*. 2008;18: 155–159.
 113. Palombo E. Phytochemicals from Traditional Medicinal Plants used in the Treatment of Diarrhoea: Modes of Action and Effects on Intestinal Function. *Phyther Res*. 2006;20: 717–724. doi:10.1002/ptr
 114. Wangensteen H, Klarpås L, Alamgir M, Samuelsen ABC, Malterud KE. Can scientific evidence support using Bangladeshi traditional medicinal plants in the treatment of diarrhoea? a review on seven plants. *Nutrients*. 2013. doi:10.3390/nu5051757
 115. Martínez GJ, Planchuelo AM. La medicina tradicional de los criollos campesinos de Paravachasca y Calamuchita, Córdoba (Argentina). *Scripto Ethnol*. 2003;25: 83–116.
 116. Campos-Navarro R, Scarpa GF. The cultural-bound disease “empacho” in Argentina. A comprehensive botanico-historical and ethnopharmacological review. *J Ethnopharmacol*. Elsevier; 2013;148: 349–360. doi:10.1016/j.jep.2013.05.002
 117. Heinrich M, Rimpler H, Barrera NA. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): Ethnopharmacologic evaluation. *J Ethnopharmacol*. 1992;36: 63–80. doi:10.1016/0378-8741(92)90062-V
 118. Berlin EA, Berlin B. Medical ethnobotany of the Highland Maya of Chiapas, Mexico: The Gastrointestinal Diseases. Princeton: Princeton University Press; 1996.
 119. Ballero M, Poli F, Santus M. Plants used in folk medicine of Monteleone (Northern Sardinia). *Fitoterapia*. 1998;69: 52–64.
 120. Tomassoni a J, Simone K. Herbal medicines for children: an illusion of safety? *Curr Opin Pediatr*. 2001;13: 162–9. doi:10.1097/00008480-200104000-00014
 121. Marquardt P, Kraft K, Nieber K. Clinical studies on herbal remedies in children: A systematic literature analysis. *Planta Med*. 2014;80. doi:10.1055/s-0034-1394641
 122. Stickel F, Seitz H. The efficacy and safety of etoricoxib. *Public Health Nutr*. 200AD;3: 501–508.
 123. Gu Y, Gu Q, Kodama H, Mueller WEG, Ushijima H. Development of antirotavirus

- agents in Asia. 2000; 440–447.
124. Mukoyama A, Sakagami H. Effect of pine seed shell extract on rotavirus and enterovirus infections. 1991; 109–111.
 125. Takahashi K, Ohashi K, Abe Y, Mori S, Taniguchi K, Ebina T, et al. Protective Efficacy of a Sulfated Sialyl Lipid (NMSO3) against Human Rotavirus-Induced Diarrhea in a Mouse Model. 2002;46: 420–424. doi:10.1128/AAC.46.2.420
 126. Takahashi K, Matsuda M, Ohashi K, Taniguchi K, Nakagomi O, Abe Y, et al. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Res.* 2001;49: 15–24. doi:10.1016/S0166-3542(00)00134-0
 127. Shao C, Lin P. Primary observation on antirotavirus effects of ACPS-R in vitro. *J Zhejiang Coll TCM.* 1991;15: 29–30.
 128. Gonçalves JLS, Lopes RC, Oliveira DB, Costa SS, Miranda MMFS, Romanos MT V, et al. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. *J Ethnopharmacol.* 2005;99: 403–407. doi:10.1016/j.jep.2005.01.032
 129. Alfajaro MM, Rho MC, Kim HJ, Park JG, Kim DS, Hosmillo M, et al. Anti-rotavirus effects by combination therapy of stevioside and *Sophora flavescens* extract. *Res Vet Sci. Elsevier Ltd;* 2014;96: 567–575. doi:10.1016/j.rvsc.2014.03.011
 130. Cecílio AB, Faria DB De, Oliveira PDC, Caldas S, Oliveira DA De, Sobral MEG, et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *J Ethnopharmacol. Elsevier Ireland Ltd;* 2012;141: 975–981. doi:10.1016/j.jep.2012.03.031
 131. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa E, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 1993;363: 446–48.
 132. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem.* 2013;82: 775–97. doi:10.1146/annurev-biochem-063011-092449
 133. Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet. Nature Publishing Group;* 2010;11: 47–59. doi:10.1038/nrg2703
 134. Flajnik MF, Deschacht N, Muyldermans S. A case of convergence: Why did a simple alternative to canonical antibodies arise in Sharks and Camels? *PLoS Biol.* 2011;9. doi:10.1371/journal.pbio.1001120
 135. Blanc MR, Anouassi A, Ahmed Abed M, Tsikis G, Canepa S, Labas V, et al. A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and

- mammalian-type gamma-globulins from camelid sera. *Biotechnol Appl Biochem*. 2009;54: 207–12. doi:10.1042/BA20090208
136. De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, et al. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103: 4586–91. doi:10.1073/pnas.0505379103
 137. Stijlemans B, Conrath K, Cortez-Retamozo V, Van Xong H, Wyns L, Senter P, et al. Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J Biol Chem*. 2004;279: 1256–61. doi:10.1074/jbc.M307341200
 138. Dumoulin M, Conrath K, Meirhaeghe AVAN, Meersman F, Heremans K, Frenken LGJ, et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci*. 2002;11: 500–15. doi:10.1110/ps.34602.500
 139. Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;77: 13–22. doi:10.1007/s00253-007-1142-2
 140. Cortez-retamozo V, Backmann N, Senter PD, Wernery U, Baetselier P De, Muyldermans S, et al. Efficient Cancer Therapy with a Nanobody-Based Conjugate. *Cancer Res*. 2004;64: 2853–2857.
 141. Baral TN, Magez S, Stijlemans B, Conrath K, Vanhollebeke B, Pays E, et al. Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nat Med*. 2006;12: 580–4. doi:10.1038/nm1395
 142. Vega CG, Bok M, Vlasova AN, Chattha KS, Gómez-Sebastián S, Nuñez C, et al. Recombinant monovalent llama-derived antibody fragments (VHH) to rotavirus VP6 protect neonatal gnotobiotic piglets against human rotavirus-induced diarrhea. *PLoS Pathog*. 2013;9: e1003334. doi:10.1371/journal.ppat.1003334
 143. Garaicoechea L, Olichon A, Marcoppido G, Wigdorovitz A, Mozgovoij M, Saif L, et al. Llama-derived single-chain antibody fragments directed to rotavirus VP6 protein possess broad neutralizing activity in vitro and confer protection against diarrhea in mice. *J Virol*. 2008;82: 9753–64. doi:10.1128/JVI.00436-08
 144. Frenken L, van der Linden R, Hermans P, Wil Bos J, Ruuls R, de Geus B, et al. Isolation of antigen specific Llama V HH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*. 2000;78: 11–21.
 145. van der Vaart JM, Pant N, Wolvers D, Bezemer S, Hermans PW, Bellamy K, et al. Reduction in morbidity of rotavirus induced diarrhoea in mice by yeast produced

- monovalent llama-derived antibody fragments. *Vaccine*. 2006;24: 4130–7.
doi:10.1016/j.vaccine.2006.02.045
146. Gómez-Sebastián S, Nuñez MC, Garaicoechea L, Alvarado C, Mozgovej M, Lasa R, et al. Rotavirus A-specific single-domain antibodies produced in baculovirus-infected insect larvae are protective in vivo. *BMC Biotechnol*. 2012;12: 59.
doi:10.1186/1472-6750-12-59
 147. Pant N, Hultberg A, Zhao Y, Svensson L, Pan-Hammarstrom Q, Johansen K, et al. Lactobacilli expressing variable domain of llama heavy-chain antibody fragments (lactobodies) confer protection against rotavirus-induced diarrhea. *J Infect Dis*. 2006;194: 1580–8. doi:10.1086/508747
 148. Pant N, Marcotte H, Hermans P, Bezemer S, Frenken L, Johansen K. Lactobacilli producing bispecific llama-derived anti-rotavirus proteins in vivo for rotavirus-induced diarrhea. *Future Microbiol*. 2011;6: 583–93.
 149. Tokuhara D, Álvarez B, Mejima M, Hiroiwa T, Takahashi Y, Kurokawa S, et al. Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. *J Clin Invest*. 2013;123: 3829–38. doi:10.1172/JCI70266
 150. Conrath KE, Lauwereys M, Galleni M, Matagne a., Frère JM, Kinne J, et al. β -Lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the Camelidae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45: 2807–2812.
doi:10.1128/AAC.45.10.2807-2812.2001
 151. Sarker SA, Jäkel M, Sultana S, Alam NH, Bardhan PK, Chisti MJ, et al. Anti-rotavirus protein reduces stool output in infants with diarrhea: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. Elsevier Ltd; 2013;145: 740–48.
doi:10.1053/j.gastro.2013.06.053
 152. Pant N, Marcotte H, Brüssow H, Svensson L, Hammarström L. Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. *BMC Microbiol*. 2007;7: 86. doi:10.1186/1471-2180-7-86
 153. Zhang Z, Xiang Y, Li N, Wang B, Ai H, Wang X, et al. Protective effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG against human rotavirus-induced diarrhoea in a neonatal mouse model. *Pathog Dis*. 2013;67: 184–91. doi:10.1111/2049-632X.12030
 154. Saif L, Yuan L, Ward L, To T. Comparative studies of the pathogenesis, antibody immune responses and homologous protection to porcine and human rotaviruses in gnotobiotic piglets. In: Springer US, editor. *Mechanisms in the Pathogenesis of*

- Enteric Diseases. 1997. p. 397–403.
155. Cornaglia, EM, Barrandeguy, M, Fijtman, N, Schudel A. Enzyme linked immunosorbent assay, immunofluorescent test and electrophoresis analysis of rotaviral RNA in the diagnosis and characterization of the bovine rotavirus. *Rev Latinoam Microbiol.* 1989; 59–62.
 156. Parreno V, Hodgins DC, De Arriba L, Kang SY, Yuan L, Ward L a., et al. Serum and intestinal isotype antibody response to Wa human rotavirus in gnotobiotic pigs are modulated by maternal antibodies. *J Gen Virol.* 1999;80: 1417–1428.
 157. Hodgins DC, Kang SY, deArriba L, Parreño V, Ward L a, Yuan L, et al. Effects of maternal antibodies on protection and development of antibody responses to human rotavirus in gnotobiotic pigs. *J Virol.* 1999;73: 186–197.
 158. Yuan L, Ward LA, Rosen BI, To TL, Saif LJ, Irol J V. Systemic and Intestinal Antibody-Secreting Cell Responses and Correlates of Protective Immunity to Human Rotavirus in a Gnotobiotic Pig Model of Disease †. 1996;70: 3075–83.
 159. Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 1999. pp. 95–98. doi:citeulike-article-id:691774
 160. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood , Evolutionary Distance , and Maximum Parsimony Methods. 2011;28: 2731–2739. doi:10.1093/molbev/msr121
 161. To TL, Ward L a, Yuan L, Saif LJ. Serum and intestinal isotype antibody responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. *J Gen Virol.* 1998;79: 2661–2672.
 162. GraphPad Software [Internet]. La Jolla California, EE.UU; 2016. Available: www.graphpad.com
 163. Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C. InfoStat versión 2014. [Internet]. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.; 2014. Available: <http://www.infostat.com.ar>
 164. MedCalc Statistical Software [Internet]. Ostend, Belgium: MedCalc Software bvba; 2016. Available: <https://www.medcalc.org>
 165. Ayala-Breton C, Arias M, Espinosa R, Romero P, Arias CF, López S. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *J Virol.* 2009;83: 8819–8831. doi:10.1128/JVI.02308-08

166. Bartke A, Chandrashekar V, Turyn D, Steger RW, Debeljuk L, Winters TA, et al. Effects of growth hormone overexpression and growth hormone resistance on neuroendocrine and reproductive functions in transgenic and knock-out mice. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999;222: 113–23. doi:pse22202 [pii]
167. Chen HL, Huang JY, Chu TW, Tsai TC, Hung CM, Lin CC, et al. Expression of VP1 protein in the milk of transgenic mice: A potential oral vaccine protects against enterovirus 71 infection. *Vaccine.* 2008;26: 2882–2889. doi:10.1016/j.vaccine.2008.03.041
168. Castilla J, Pintado I, Sola J, Sanchez-Morgado, M Enjuanes L. Engineering passive immunity in transgenic mice secreting virus-neutralizing antibodies in milk. *Nat Biotechnol.* 1998;16: 349–354.
169. Pollock DP, Kutzko JP, Birck-Wilson E, Williams JL, Echelard Y, Meade HM. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J Immunol Methods.* 1999;231: 147–157. doi:10.1016/S0022-1759(99)00151-9
170. Stowers AW, Chen Lh L, Zhang Y, Kennedy MC, Zou L, Lambert L, et al. A recombinant vaccine expressed in the milk of transgenic mice protects Aotus monkeys from a lethal challenge with *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99: 339–344. doi:10.1073/pnas.012590199
171. Zinovieva N, Lassnig C, Schams D, Besenfelder U, Wolf E, Müller S, et al. Stable production of human insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in the milk of hemi- and homozygous transgenic rabbits over several generations. *Transgenic Res.* 1998;7: 437–447. doi:10.1023/A:1008831028620
172. Wall RJ, Pursel VG, Shamay a, McKnight R a, Pittius CW, Hennighausen L. High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88: 1696–1700. doi:10.1073/pnas.88.5.1696
173. Ebert KM, Selgrath JP, DiTullio P, Denman J, Smith TE, Memon M a, et al. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Nat Biotechnol.* 1991;9: 835–838. doi:10.1038/nbt0991-835
174. Salamone D, Baraňao L, Santos C, Bussmann L, Artuso J, Werning C, et al. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J Biotechnol.* 2006;124: 469–72. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.01.005
175. Tradtrantip L, Ko E-A, Verkman AS. Antidiarrheal efficacy and cellular mechanisms

of a Thai herbal remedy. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8: e2674.
doi:10.1371/journal.pntd.0002674