



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

**Descifrando las interacciones entre la microbiota
intestinal / virus entéricos / hospedador: bases
para proteger frente a la diarrea viral**

Tesis doctoral

Cristina Santiso Bellón

Directores:

Jesús Rodríguez Díaz

Javier Buesa Gómez

Programa de Doctorado en
Biomedicina y Biotecnología

València, octubre 2023



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  Facultat de Medicina i Odontologia
Departament de Microbiologia i Ecologia

Javier Buesa Gómez, Doctor en Medicina y Catedrático de Microbiología de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València, y

Jesús Rodríguez Díaz, Doctor en Biología y Profesor Titular de Microbiología de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València,

INFORMAN

Que el presente trabajo de investigación titulado **“Descifrando las interacciones entre la microbiota intestinal / virus entéricos / hospedador: bases para proteger frente a la diarrea viral”** ha sido realizado bajo nuestra dirección por D^a **Cristina Santiso Bellón**, graduada en Biología, para optar al título de Doctora.

En Valencia, 28 de septiembre de 2023

Dr. Javier Buesa Gómez

Dr. Jesús Rodríguez Díaz

Dr. Julio Sanjuán Arias

Tutor

Esta tesis ha sido desarrollada en el Departamento de Microbiología y Ecología de la Facultad de Medicina de la Universitat de València gracias a la ayuda predoctoral PRE2018-083315, financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MCIN/AEI/10.13039/501100011033) y por el Fondo Social Europeo (“FSE Invierte en tu futuro”).



AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Dedicar este trabajo a todas las personas que han formado parte de esta larga travesía es un auténtico privilegio.

Agradezco a mis directores, Javier Buesa y Jesús Rodríguez, por haberme dado la oportunidad de formarme profesionalmente como investigadora en el campo de la Microbiología. Muchas gracias, Javier, por haber apostado (a ciegas) por mí sin tener referencia alguna y sabiendo que apenas tenía experiencia. Fuiste el iniciador de mi carrera científica y por eso mereces una mención especial en este apartado. Te debo mucho. Gracias a ti, Jesús, por haberme enseñado tanto, no sólo profesionalmente, sino a nivel personal. Has conseguido mantener mi curiosidad por la ciencia. Debo agradecerte mucho por haber volcado tu experiencia guiándome en este camino de obstáculos, ayudando a rellenar los huecos curriculares necesarios para asegurar un futuro en la investigación. Por esos momentos compartidos intentando resolver los problemas científicos del mundo, por esas risas infinitas, por enseñarme un buen repertorio de chistes malos y por haberme dado la oportunidad de poder realizar este trabajo con el que tanto he disfrutado. Eres y serás mi referente.

A todas las personas con las que he compartido tantas horas en el laboratorio y han hecho que sea fácil acudir cada día al “trabajo”. Robertote, eres mi comodín de la llamada. Siempre disponible para resolver cualquier duda, no sólo técnica, sino de todo tipo. Me has enseñado mucho. A Antoñito, siempre dispuesto a descolgar el teléfono cuando le llamo, aún sabiendo que es para darle trabajo. He disfrutado mucho de tu compañía, de tus anécdotas y sí, de tus chistes. A Carmen y Elvira, nuestras mamis, agradeceremos por todo el apoyo recibido durante tantos años y por vuestros grandes consejos de vida. Habéis sido imprescindibles en este ciclo de mi vida. A Susana y a Noelia, por ser las primeras compañeras en recibirme en este grupo y por todo lo que hemos compartido (risas, sobre todo) en estos años. A Juliana, que en pocos meses de estancia conseguiste ocupar un trocito en mi vida y hemos (y podremos) compartido muy buenas experiencias. A Sibele, por ayudar a ver siempre la parte más positiva y contagiarme de tu optimismo. Por muchos años más. A Irene (o también pdm), por emocionarnos cantando a gritos mientras pipeteamos. A Noemí, por haber aguantado mi falta de sueño y estar siempre dispuesta a recibir dignamente mis bromas. Espero que sigamos compartiendo más bailes entre pipeteo y pipeteo y disfrutemos de nuestros

AGRADECIMIENTOS

debates científicos. A mi dibujito animado, Nazaret, por haber compartido tantas risas (muchas a costa de Noemí) y ponerme al día con los últimos hits musicales. A Eva, que sé que cuando venía a por la multicanal era para quedarse con nosotros, se veía venir. A mi Robertito, porque no sólo te ofreces para resolver cualquier desafío, sino que siempre estás dispuesto a ayudar y hacernos disfrutar con tus bromas y anécdotas. A mi ricitos, Sergi, porque eres una bellísima persona y un gran compañero. Vaya pareja va a continuar con nuestro legado. A mi andaluza preferida, Carmen, porque llegaste y nos abriste la puerta de tu casa como si nos conociéramos desde siempre. A Vicente, M^a Jesús, Dani y Carmen, por haberme ofrecido un hueco en vuestro laboratorio y haber contribuido a mi ampliación de conocimientos. A Carlos, por haber invertido tu tiempo en la revisión de este manuscrito. Sé que me dejo a mucha gente que, aunque de forma breve, ha formado parte de esta historia (Eva, Pedro, Laia, Silvia, Victor, Ester, Dani, Sara, etc). A todos, gracias por contribuir con este espíritu tan especial que nos caracteriza como grupo. Os quiero.

A mis queridos padres. No hay palabras suficientes para agradecer la confianza que siempre habéis tenido en mí y el apoyo inquebrantable que me habéis dado, sobre todo en esos momentos de grandes desafíos. Gracias por vuestra paciencia. Esta tesis no solo representa mi esfuerzo, sino también el vuestro. A ti, papá, porque te has sacrificado trabajando para que no nos faltara de nada y, gracias a ello, tus hijos hemos podido alcanzar nuestros sueños. A ti, mamá, porque eres la persona más fuerte y bondadosa que conozco. Has dedicado tu vida a tus hijos y te debemos todo lo que somos. Os quiero.

Por último, a mi compañero de vida. Nos conocimos en el inicio de esta larga travesía, cuando todavía ignorábamos el camino que nos iba a tocar recorrer. Recuerdo el primer día que hablamos, cuando estaba en las escaleras porque no sabía dónde era la clase de matemáticas. Suerte que también llegabas tarde. Quién diría en ese momento que íbamos a compartir el resto de la vida, que íbamos a crear vida. Gracias por el apoyo incondicional que me has brindado. Has contribuido enormemente a que siguiera por este camino. A mi hijo, que llegaste en el inicio de este viaje y no sólo has contribuido materialmente, sino que me has dotado con mayores capacidades, sobre todo de paciencia, para llevar a cabo este reto. Esta tesis también os la debo a vosotros. Os amo.

ÍNDICE

ÍNDICE

I.	ABREVIATURAS	i
II.	ÍNDICE DE FIGURAS	v
III.	ÍNDICE DE TABLAS	xi
IV.	RESUMEN	xv
V.	INTRODUCCIÓN	1
1.	Virus entéricos y su impacto en la salud humana.....	3
1.1.	Principales características de rotavirus.....	4
1.2.	Principales características de norovirus.....	6
2.	Interacción entre los virus entéricos y el hospedador	8
2.1.	Proteína VP4 de rotavirus	8
2.2.	Proteína VP1 de norovirus	9
2.3.	Síntesis de antígenos del grupo histosanguíneo.....	9
2.4.	Interacción entre antígenos del grupo histosanguíneo y virus entéricos.....	12
3.	Interacción entre el hospedador y la microbiota	14
4.	Interacción entre la microbiota y los virus entéricos	16
4.1.	La microbiota y los virus entéricos: estudios <i>in vitro</i> y en el modelo animal	19
4.2.	La microbiota y los virus entéricos: estudios en humanos	26
VI.	OBJETIVOS	33
VII.	MATERIAL Y MÉTODOS	37
1.	Detección y tipificación de rotavirus y norovirus a partir de muestras clínicas....	39
1.1.	Recolección de muestras	39
1.2.	Extracción de ARN y transcripción reversa	40
1.3.	Caracterización genotípica de las muestras clínicas	41
1.4.	Secuenciación Sanger.....	43
2.	Obtención de partículas virales de rotavirus G1P[8], norovirus GII.4 Sydney 2012 [P16] y VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012.....	44
2.1.	Partículas de rotavirus G1P[8].....	44
2.2.	Partículas de norovirus GII.4 Sydney 2012.....	45
2.3.	VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012.....	46

ÍNDICE

3. Obtención y purificación de anticuerpos policlonales	48
3.1. Comprobación de la pureza de los anticuerpos.....	49
3.2. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos	50
4. Identificación de los componentes de la microbiota que interaccionan físicamente con rotavirus y norovirus.....	50
4.1. Aislamiento de microbiota a partir de heces humanas	50
4.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	54
4.3. Ensayos de unión entre bacterias y rotavirus Wa	55
4.4. Ensayos de unión entre bacterias y VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012	56
4.5. Detección de componentes similares a HBGAs expresados sobre bacterias	57
4.6. Bloqueo de la infección de rotavirus con <i>Ruminococcus gauvreauii</i>	59
4.7. Bloqueo de la adhesión de norovirus con <i>Rhodococcus</i> spp.	60
5. Estudio del papel de la microbiota en la infección por rotavirus y norovirus humanos en un modelo murino	61
5.1. Preparación de la microbiota para el trasplante fecal	61
5.2. Procedimiento experimental con ratones.....	62
5.3. Nivel de expresión de biomarcadores inmunológicos y <i>Fut2</i>	64
6. Cuantificación de la carga viral.....	67
6.1. Cuantificación de rotavirus Wa	67
6.2. Cuantificación de norovirus GII.4 Sydney 2012	68
7. Extracción y cuantificación del ADN ribosomal 16S.....	69
7.1. Extracción de ADN total	69
7.2. Cuantificación de bacterias totales	70
8. Secuenciación y análisis de la microbiota	71
8.1. Análisis metagenómico de las bacterias que interaccionan físicamente con rotavirus y norovirus	73
8.2. Análisis metagenómico de la microbiota relacionada con la susceptibilidad de los ratones a la infección por rotavirus y norovirus	74
9. Análisis de correlación de Pearson.....	75
VIII. RESULTADOS	77
1. Identificación de los miembros de la microbiota que interaccionan físicamente con rotavirus y norovirus en humanos	79

ÍNDICE

1.1. Rotavirus	79
1.2. Norovirus.....	83
2. Estudio del papel de la microbiota en la infección por rotavirus y norovirus humanos en un modelo murino	89
2.1. Rotavirus	90
2.2. Norovirus.....	106
IX. DISCUSIÓN	121
X. CONCLUSIONES	147
XI. BIBLIOGRAFÍA	151
XII. APÉNDICE	185

I. ABREVIATURAS



I. ABREVIATURAS

ABO: gen ABO que codifica para las enzimas A y B	MMTV: virus del tumor mamario de ratón
ADNc: ADN complementario	MNV: norovirus murino
ADNr: ADN ribosomal	MOI: multiplicidad de infección
ARNm: ARN mensajero	MRV: rotavirus murino
ARNsc: ARN de simple cadena	NLR: receptor tipo <i>NOD</i>
BHI: infusión de cerebro y corazón	NoV: norovirus
BSA: albúmina sérica bovina	NSPs: proteínas no estructurales
CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades	OMS: Organización Mundial de la Salud
DPI: días posteriores a la infección	ON: durante la noche
EMCV: virus de la encefalomiелitis miocárdica	OPV: vacuna frente a la poliomielitis
EPS: exopolisacárido	ORFs: pautas abiertas de lectura
FACS: clasificación de células activada por fluorescencia	OTU: unidades taxonómicas operativas
FDR: tasa de descubrimientos falsos.	P: dominio protuberante de la proteína VP1 de norovirus
FFU: unidades de focos fluorescentes	PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
FMT: trasplante de microbiota fecal	PCoA: análisis de coordenadas principales
FSC: detector de dispersión frontal	PFA: paraformaldehído
FUT2 o <i>fut2</i> : α -1,2 fucosiltransferasa o gen que codifica FUT2	RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN
FUT3 o <i>fut3</i> : α -1,3/ α -1,4 fucosiltransferasa o gen que codifica FUT3	RMN: resonancia magnética nuclear
GAMc: medio anaerobio de Gifu	RV: rotavirus
GCE: equivalentes de copias genómicas	RVA: rotavirus del grupo A
GEA: gastroenteritis aguda	S: dominio <i>shell</i> de la proteína VP1 de norovirus
HBGAs: antígenos de grupo histosanguíneo	SFB: bacterias filamentosas segmentadas
HRV: rotavirus humano	SS: suero salino al 0,9 %
HSA: albúmina de suero humana	SSC: detector de dispersión lateral
HuNoV: norovirus humano	TAK-214: candidata a vacuna (basada en subunidad) frente a norovirus
IFN: interferón	TEM: microscopía electrónica de transmisión
IL: interleucina	TLR: receptor tipo <i>toll</i>
LDA: análisis de discriminación lineal	TSS: suma total de cuadrados
LEfSe: análisis de discriminación lineal por efecto del tamaño	UFC: unidades formadoras de colonia
LOS: lipooligosacáridos	VLPs: partículas pseudovíricas
LPS: lipopolisacáridos	VPs: proteínas virales
MD2: factor de diferenciación mieloide 2	VRS: virus respiratorio sincitial
MEM: medio mínimo esencial	

II. ÍNDICE DE FIGURAS



II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Patrón genético y estructura atómica de rotavirus	5
Figura 2. Organización genómica y estructura atómica de la cápside de norovirus	7
Figura 3. Modelo atómico de la espícula VP4 de rotavirus.....	8
Figura 4. Estructura atómica del dominio P de la proteína VP1 de norovirus	9
Figura 5. Ruta de biosíntesis de los antígenos del grupo histosanguíneo de tipo 1 y 2. 11	
Figura 6. Posibles interacciones de la microbiota intestinal con los virus entéricos.....	17
Figura 7. Efectos sobre la infección viral influenciados por la interacción cruzada entre la microbiota y el hospedador.....	18
Figura 8. Resumen del sistema de protección del hospedador promovido por <i>Candidatus arthromitus</i> frente a la infección por rotavirus murino	21
Figura 9. Efecto de la modulación de la microbiota en la eficacia de la vacuna Rotarix® en adultos	30
Figura 10. Esquema del protocolo de expresión de VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012 en células de insecto <i>Sf9</i>	46
Figura 11. Visualización de la expresión y purificación de las VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012.....	48
Figura 12. Visualización de la pureza de los anticuerpos IgG.....	49
Figura 13. Evaluación de la especificidad del anticuerpo anti-VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012.....	50
Figura 14. Clasificación de células por fluorescencia de la microbiota fecal unida a rotavirus G1P[8].....	52
Figura 15. Diseño experimental realizado con ratones	62
Figura 16. Bacterias que unen rotavirus G1P[8].....	80
Figura 17. Interacción entre <i>Ruminococcus gauvreauii</i> y rotavirus Wa.	81
Figura 18. <i>Ruminococcus gauvreauii</i> expresa compuestos similares a los antígenos del grupo histosanguíneo en su superficie.....	82
Figura 19. <i>Ruminococcus gauvreauii</i> e infectividad <i>in vitro</i> de rotavirus Wa.....	83
Figura 20. Análisis de discriminación lineal de géneros bacterianos aislados de muestras clínicas con norovirus	84
Figura 21. Bacterias que unen norovirus GII.4 Sydney 2012.....	85

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 22. Interacción entre <i>Rhodococcus</i> spp. y las VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012	86
Figura 23. <i>Rhodococcus</i> spp. expresa compuestos similares a los antígenos del grupo histosanguíneo en su superficie	87
Figura 24. Interacción de las VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012 con los antígenos del grupo histosanguíneo	87
Figura 25. Efecto de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> sobre la adhesión de VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012 a células HT-29M6.....	88
Figura 26. Diversidad beta a nivel de OTU en ratones infectados con rotavirus Wa	90
Figura 27. Distribución de taxones bacterianos en los grupos de ratones infectados con rotavirus Wa.....	92
Figura 28. Excreción de rotavirus Wa en las heces de ratones	93
Figura 29. Cuantificación de bacterias totales en las heces de ratones previa a la infección con rotavirus Wa.....	94
Figura 30. Diversidad alfa a nivel de OTU en ratones infectados con rotavirus Wa.....	96
Figura 31. Biomarcadores bacterianos (LEFse) con diferencias entre los grupos de ratones infectados con rotavirus Wa	97
Figura 32. Mapa de calor de la matriz de correlación de Pearson entre el nivel de excreción viral de rotavirus Wa y la abundancia de los taxones bacterianos	99
Figura 33. Expresión de marcadores inmunitarios y <i>Fut2</i> en el intestino de ratones infectados con rotavirus Wa	102
Figura 34. Diversidad beta a nivel de OTU en ratones infectados con norovirus GII.4 Sydney [P16]	107
Figura 35. Distribución de taxones bacterianos en los grupos de ratones infectados con norovirus GII.4 Sydney 2012 [P16]	109
Figura 36. Excreción de norovirus GII.4 Sydney [P16] en las heces de ratones	110
Figura 37. Cuantificación de bacterias totales en las heces de ratones previa a la infección con norovirus GII.4 Sydney 2012 [P16].....	111
Figura 38. Diversidad alfa a nivel de OTU en ratones infectados con norovirus GII.4 Sydney 2012 [P16]	112

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 39. Biomarcadores bacterianos (LEFse) con diferencias entre los grupos de ratones infectados con norovirus GII.4 Sydney 2012 P[16]	113
Figura 40. Mapa de calor de la matriz de correlación de Pearson entre el nivel de excreción viral de norovirus GII.4 Sydney 2012 P[16] y la abundancia de los taxones bacterianos	115
Figura 41. Expresión de marcadores inmunitarios y <i>Fut2</i> en el intestino de ratones infectados con norovirus GII.4 Sydney 2012 [P16]	118

III.ÍNDICE DE TABLAS



III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mezcla de reacción para la transcripción reversa de ARN viral.	40
Tabla 2. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de los genes <i>VP7</i> y <i>VP4</i> de rotavirus.	41
Tabla 3. Información de las secuencias de los cebadores usados para el tipado de <i>VP7</i> (G) y <i>VP4</i> (P) de rotavirus.	42
Tabla 4. Mezcla de reacción para la PCR de tipado de <i>VP7</i> y <i>VP4</i> de rotavirus.	42
Tabla 5. Mezcla de reacción para la PCR de amplificación de los genes <i>RdRP</i> y <i>VP1</i> de norovirus GII.	43
Tabla 6. Especies de <i>Rhodococcus</i> utilizadas y condiciones de cultivo.	54
Tabla 7. Información de las secuencias de los cebadores usados en la qPCR de expresión de los biomarcadores inmunológicos.	65
Tabla 8. Mezcla de reacción de qPCR para la cuantificación de la expresión de biomarcadores inmunológicos.	66
Tabla 9. Mezcla de reacción de qPCR para la cuantificación de la expresión de la glicosiltransferasa <i>Fut2</i>	66
Tabla 10. Mezcla de reacción para la cuantificación de rotavirus mediante RT-qPCR. ...	68
Tabla 11. Mezcla de reacción para la cuantificación de norovirus GII mediante RT-qPCR.	69
Tabla 12. Mezcla de reacción para la cuantificación de bacterias en los 4 grupos de ratones.	70
Tabla 13. Correlación entre la abundancia de géneros asociados con la infección por rotavirus Wa y la expresión de mediadores inmunológicos.	104
Tabla 14. Correlación entre la abundancia de los géneros bacterianos y la expresión de <i>Fut2</i> en los ratones del experimento de infección con rotavirus Wa	106
Tabla 15. Correlación entre la abundancia de géneros asociados con la infección por norovirus GII-4 Sydney 2012 [P16] y la expresión de mediadores inmunológicos	120

IV. RESUMEN



IV. RESUMEN

Los virus entéricos, como rotavirus (RV) y norovirus (NoV), tienen un impacto significativo en la salud humana, causando enfermedades diarreicas que pueden llevar a la deshidratación y la muerte, especialmente en niños menores de 5 años en países de bajos ingresos.

Ambos virus interactúan con los antígenos del grupo histosanguíneo (HBGAs), los cuales son carbohidratos complejos presentes en la mucosa del tracto digestivo y de otros tejidos. La interacción entre los virus y los HBGAs desempeña un papel crucial en la infección y su unión muestra variabilidad dependiendo del genotipo viral y del tipo de HBGA.

Además de los HBGAs, se ha descubierto que otros factores, como la microbiota intestinal, pueden influir en la interacción de los virus con las células hospedadoras. La composición de la microbiota intestinal desempeña un papel importante en la resistencia o susceptibilidad a las infecciones por virus entéricos. Todavía quedan lagunas relacionadas con el conocimiento de los mecanismos por los cuales la microbiota influye sobre la infección, ya que se ha determinado tanto efectos positivos como negativos. Sin embargo, se ha sugerido que la unión de las partículas virales a bacterias o a sus componentes solubles (compuestos similares a HBGAs) podría facilitar la eliminación de los virus a través de las heces o, por el contrario, estabilizar su adhesión a las células intestinales. Además, la microbiota podría influir en la producción o degradación de la mucosa, lo que afectaría al acceso de los virus a las células diana. También podría modificar el estado de glicosilación de la mucosa, influyendo en la adhesión viral y, por último, la respuesta inmune desencadenada por la microbiota podría tener un impacto en la infección viral.

Con el propósito de ampliar nuestro entendimiento sobre la relación entre la microbiota y los virus, esta tesis tuvo como objetivo principal desvelar qué bacterias establecen interacciones físicas con rotavirus y norovirus y cómo lo hacen. Esto se logró mediante el aislamiento de dichas bacterias a partir de muestras clínicas y la caracterización posterior de la interacción con los virus. Hallamos que el género *Ruminococcus* y *Rhodococcus* interaccionan físicamente con RV y NoV, respectivamente y, además, bloquearon la infección/adhesión de estos virus *in vitro*, posiblemente por la

IV. RESUMEN

unión de las partículas virales a compuestos similares a HBGAs presentes en la superficie bacteriana.

Otro de los objetivos principales fue comprender los posibles mecanismos a través de los cuales ciertos grupos bacterianos podrían influir en la infección de cepas humanas en un modelo de ratón. Dado que estos virus afectan principalmente a la población infantil, exploramos la hipótesis de si el trasplante de microbiota humana proveniente de lactantes podría favorecer la infección en el modelo murino. Los resultados mostraron que, independientemente del tipo de microbiota, los ratones mantenidos con antibióticos presentaron una mayor duración y nivel de excreción viral que el resto de los ratones. También demostramos que la microbiota humana es más permisiva a la infección de RV que de NoV en el modelo murino y hallamos distintos taxones relacionados con la restricción/permisibilidad de la infección viral. Por último, nuestros resultados sugieren que uno de los mecanismos a través de los cuales la microbiota influye sobre la infección implica la modulación de la respuesta inmune innata. Para realizar estos avances hemos establecido un nuevo modelo murino inmunocompetente para estudiar la replicación de estos virus *in vivo*, superando la brecha de ausencia de un modelo de animal pequeño para el estudio de rotavirus y norovirus humano.

V. INTRODUCCIÓN



V. INTRODUCCIÓN

1. Virus entéricos y su impacto en la salud humana

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2019 la enfermedad diarreica fue considerada una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial en todos los grupos etarios (1,5 millones de muertes al año). Cada año se registran casi 1.700 millones de casos de enfermedades diarreicas en la infancia y, en niños menores de 5 años, la diarrea es la segunda causa de mortalidad a nivel mundial, provocando aproximadamente 525.000 muertes al año en niños menores de 5 años^{1,2}.

Las infecciones virales son la causa más común de gastroenteritis aguda (GEA). Los virus entéricos, como los norovirus (NoV) y los rotavirus (RV) causan diarrea, náuseas y/o vómitos, entre otros síntomas, lo que puede llevar a la muerte por deshidratación en los casos más graves. RV afecta principalmente a niños menores de 5 años y personas de edad avanzada, mientras que NoV causa sintomatología en todos los grupos de edad. Estas infecciones se producen por el consumo de agua o alimentos contaminados, mediante transmisión de persona a persona por contacto directo y por exposición a aerosoles. El principal modo de transmisión es la vía fecal-oral³.

Hasta la introducción de las vacunas en los programas universales de inmunización (2008), RV fue considerado el responsable de aproximadamente 453.000 muertes al año de niños menores de 5 años, la mayoría en países de bajos ingresos⁴. Esta cifra ha disminuido paulatinamente a medida que más países han ido incorporando las vacunas frente a este patógeno en sus programas de inmunización (146.000 muertes/año en 2015)⁵. Sin embargo, a medida que los casos de diarrea grave causada por RV han ido descendiendo, NoV se ha ido convirtiendo en la causa principal de GEA viral. Según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, del inglés Centers for Disease Control and Prevention; Atlanta, GA, EE. UU.), de los 685 millones al año de casos estimados de infección por NoV, 200 millones se producen en niños menores de 5 años y, de estos, NoV es el responsable de la muerte de 50,000 niños⁶. Además, NoV es el principal causante de brotes esporádicos de GEA debida al consumo de alimentos, representando aproximadamente el 50 % de todos los brotes a nivel mundial^{7,8}. A diferencia de los RV, no existen vacunas disponibles contra NoV, aunque algunas candidatas están en desarrollo⁹.

V. INTRODUCCIÓN

Diversas características hacen de estos virus unos patógenos muy contagiosos: baja dosis infectiva (menos de 100 partículas virales), gran cantidad de partículas excretadas en las heces (más de 10^9 partículas víricas por gramo), liberación prolongada del virus, incluso una vez remitidos los síntomas, y elevada estabilidad de su integridad estructural en diversas condiciones ambientales^{8,10}. El periodo de incubación de RV es de 24 a 72 horas, pudiendo producirse desde infecciones asintomáticas hasta gastroenteritis grave. La complicación más grave de esta enfermedad es la deshidratación, aunque se han presentado casos de complicaciones neurológicas como convulsiones afebriles y meningoencefalitis¹¹. En general, el periodo de incubación de NoV suele oscilar entre 24-48h y los síntomas suelen desaparecer a los 2-3 días.

1.1. Principales características de rotavirus

El género *Rotavirus* pertenece a la familia *Sedoreoviridae* y está compuesto por virus no envueltos con un genoma constituido por 11 segmentos de ARN bicatenario que codifican seis proteínas virales estructurales (VPs, del inglés *viral protein*) y seis proteínas no estructurales (NSPs, del inglés *non-structural protein*), estas últimas con diversas funciones en la replicación, en el ensamblaje de los virus progenie y en la evasión del sistema inmune del huésped¹².

En la Figura 1A se muestra el patrón electroforético en gel de poliacrilamida de los 11 segmentos génicos de rotavirus A (RVA), el tipo o especie más frecuente en humanos. Cada segmento codifica una única proteína, a excepción del segmento 11 que codifica dos proteínas no estructurales (NSP5 y NSP6). En la Figura 1B se observa la representación estructural de una partícula viral de RV, en la cual se indica la localización de las proteínas estructurales. La capa interna de la cápside está compuesta por las proteínas VP1 (ARN polimerasa dependiente de ARN), VP2 y VP3 (enzima viral), mientras que la capa intermedia presenta únicamente la proteína VP6, la cual determina los grupos o especies de RV y es la más abundante del virión. Por último, la cubierta externa de las partículas virales está constituida por 260 trímeros de VP7 (glicoproteína o proteína G) y 60 trímeros de VP4 (proteína sensible a proteasa o proteína P), para dar lugar a una partícula viral con isometría T=13. La proteína VP4 es escindida en dos polipéptidos VP5* y VP8* durante el paso por el aparato digestivo, estando la porción VP8*, como veremos más adelante, involucrada en el reconocimiento de distintos factores del huésped.

V. INTRODUCCIÓN

Los RV se clasifican en 10 grupos o especies (A-J) según la diversidad genética y la antigenicidad de la proteína VP6¹³. Los grupos A, B y C son las especies más comunes que infectan a los animales, incluidos los humanos, siendo el grupo A el más prevalente. Este grupo se clasifica además en genotipos G y P dependiendo de la variabilidad de los genes que codifican las proteínas de la cápside externa VP7 y VP4, respectivamente. A nivel mundial, las cepas más comúnmente detectadas en humanos son G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] y G12P[8], siendo G1P[8] la más prevalente¹⁴.

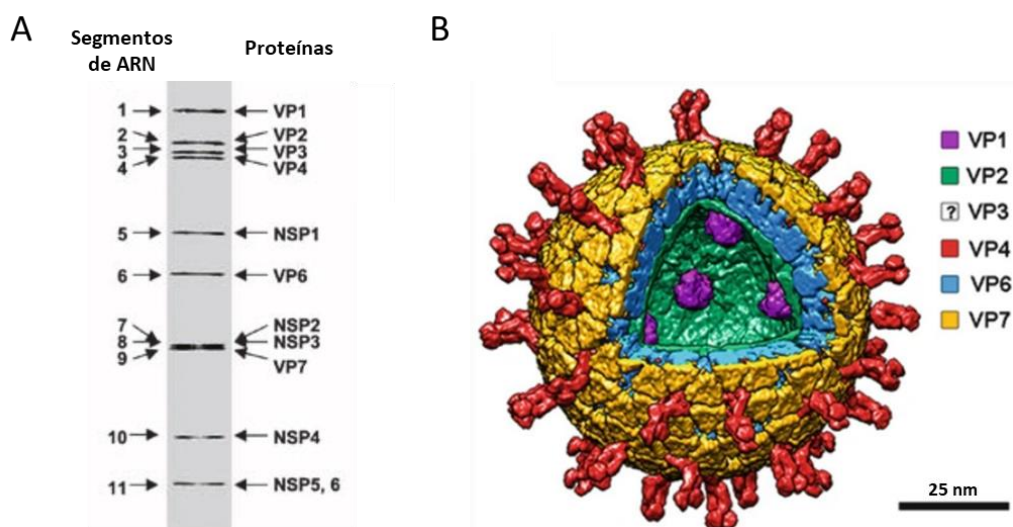


Figura 1. Patrón genético y estructura atómica de rotavirus. A) Electroforesis en gel de poliacrilamida que muestra los segmentos de ARN de RVA y las proteínas que codifica cada gen. Los segmentos están enumerados de acuerdo con el orden de migración en el gel. Adaptado de Pesavento J *et al.*, 2006¹⁵ B) Representación atómica del virión donde se puede observar la localización de cada proteína estructural codificada con colores, excepto la VP3 que no está localizada en el modelo. Las espículas proteicas (VP4) se muestran en rojo mientras que la capa más externa de la cápside (VP7) se identifica en amarillo. Adaptado de Rodríguez & Luque, 2019¹⁶.

Actualmente, existen cuatro vacunas comercializadas frente a RVA: Rotarix®, RotaTeq®, ROTAVAC® y Rotasiil®. Las dos primeras son las más extendidas a nivel mundial mientras que Rotavac® sólo se ha autorizado en la India, Ghana y Benin; y Rotasiil® en Kirgizstan, República del Congo y Burkina Faso. Por ahora, 123 países del mundo han introducido la vacuna en sus programas de inmunización. Sin embargo, todavía quedan 71 países sin vacuna alguna¹⁷. Rotarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica) es una vacuna monovalente de una cepa clínica de RV humano (RIX4414) cuyo genotipo es G1P[8], mientras que RotaTeq® (Merck and Co., West Point, PA, EE. UU.) es una vacuna recombinante y pentavalente de origen humano-bovino, y está compuesta por los genotipos G1 a G4 y el genotipo P[8] de diferentes cepas humanas usando como soporte

V. INTRODUCCIÓN

a la cepa bovina WC3 de genotipo G6P[5]^{18,19}. ROTAVAC® (Bharat Biotech International, India) es una vacuna viva, atenuada y monovalente proveniente de una cepa salvaje de origen humano y bovino (116E), la cual presenta el genotipo G9P[11]²⁰. Por último, Rotasiil® (Serum Institute of India) es una vacuna pentavalente que contiene cepas de reordenamientos humano-bovino con los serotipos G1, G2, G3, G4, y G9 y P[5]²¹.

Como se ha comentado anteriormente, la introducción de las vacunas de RV ha permitido disminuir el número de muertes debidas a RVA. En países desarrollados, ha demostrado tener una elevada efectividad en la prevención de diarrea causada por RVA (> 85 %), resultando en una disminución en el número de hospitalizaciones y en visitas ambulatorias²². No obstante, esta efectividad es menor en algunos países de bajos ingresos, especialmente en África subsahariana y Asia^{22,23}. Los motivos de estas diferencias en la eficacia podrían deberse a razones multifactoriales como son la distribución desigual de los genotipos de RVA, el estado de salud general (microbiota, infecciones y respuesta inmune) y los factores genéticos del hospedador (antígenos del grupo histosanguíneo o HBGAs de la mucosa intestinal).

1.2. Principales características de norovirus

NoV es un virus no envuelto que pertenece a la familia *Caliciviridae*. Su genoma está compuesto por una molécula de ARN de simple cadena (ARNsc), polaridad positiva y un tamaño de 7,5 - 7,7 Kb, que está organizada en tres pautas abiertas de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés). ORF1 codifica para una poliproteína no estructural (NS1 a NS7), incluida la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). ORF2 codifica la VP1 (proteína mayoritaria de la cápside), mientras que ORF3 codifica la VP2 (proteína minoritaria de la cápside) (Figura 2). VP1 se estructura en dos partes principales: el dominio *shell* (S) y el dominio protuberante (P)²⁴. El dominio P, a su vez, se divide en subdominios P1 y P2. El subdominio P1 desempeña la función de anclaje del dominio P, conectándolo con el dominio S. Por otro lado, el subdominio P2 es altamente variable y constituye la región más expuesta en la superficie de la cápside de NoV. Es en el subdominio P2 donde se encuentran los sitios de unión a los HBGAs, los cuales están involucrados en la infección por NoV en humanos. Además, el subdominio P2 es la diana de los anticuerpos

V. INTRODUCCIÓN

neutralizantes^{25,26}.

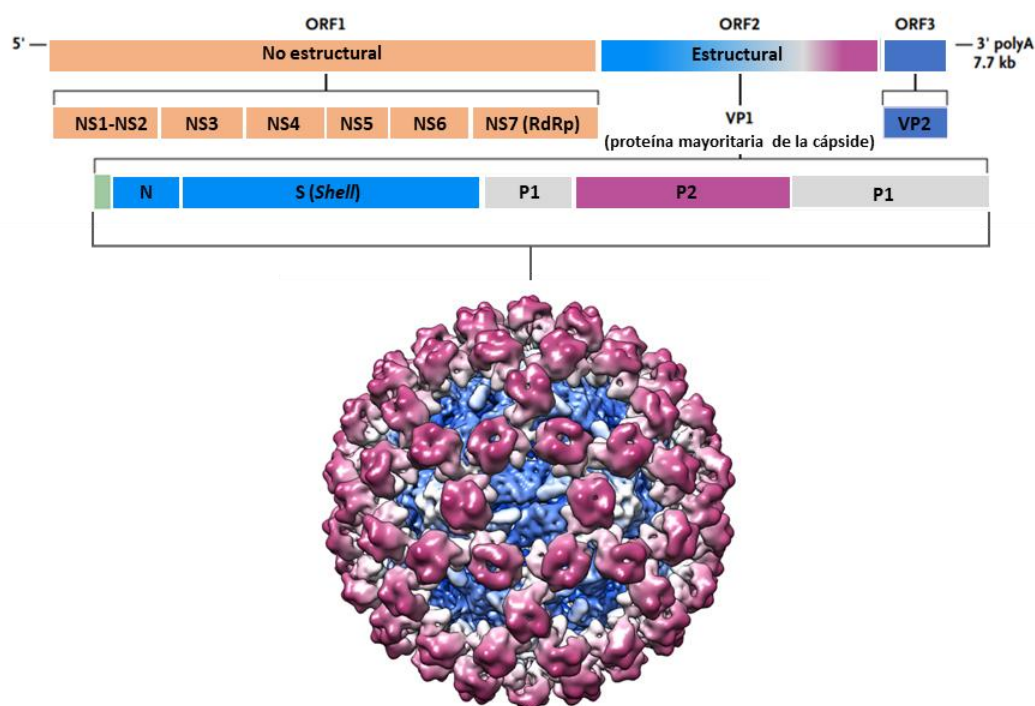


Figura 2. Organización genómica y estructura atómica de la cápside de norovirus. Se muestra la organización genómica del ARNsc de NoV con las tres ORFs. Se presenta una imagen de criomicroscopía electrónica de una partícula pseudovírica (VLP, del inglés *viral-like particle*) formada por las proteínas VP1 y VP2 del genotipo GII.4 Sydney 2012. Se puede apreciar los distintos dominios de VP1 caracterizados por distintos colores: el dominio *shell* (S) se representa en color azul mientras que el dominio protuberante se muestra en color gris (subdominio P1) y magenta (subdominio P2). N: dominio N terminal. Imagen propia.

Basándose en el análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos de VP1, NoV se ha clasificado en 10 genogrupos distintos (GI a GX). A su vez, los genogrupos se subdividen en genotipos (GI.X o GII.X) y, hasta la fecha, se han identificado 49 genotipos G diferentes. Por otro lado, basándonos en la diversidad de la RdRp, los genogrupos P se subdividen a su vez en 60 genotipos. Aunque la diversidad de NoV es elevada, solo los genogrupos GI, GII y GIV causan enfermedades en humanos, siendo GI y GII los que más infecciones causan a nivel mundial y, de estos, la variante GII.4 Sydney 2012 es considerada la causa más frecuente de brotes de NoV humano (HuNoV)²⁷.

Un dato importante sobre la biología de estos virus es que ambos genogrupos I y II utilizan en los primeros pasos de la infección viral carbohidratos como receptores y/o co-receptores del hospedador, como son los HBGAs.

V. INTRODUCCIÓN

2. Interacción entre los virus entéricos y el hospedador

La unión a los carbohidratos es un método común que muchos virus y otros microorganismos utilizan para adherirse a las células de su hospedador. En el caso de RV y NoV, varios estudios demuestran que los HBGAs actúan como sus receptores y /o correceptores²⁸⁻³⁰. Como es de esperar, las proteínas expuestas en la cápside viral son las principalmente implicadas en el reconocimiento por parte del hospedador (respuesta inmune) y, además, en ellas se encuentran las regiones de interacción con los receptores celulares (HBGAs) que permitirán continuar con el proceso de infección. A continuación, se presenta de manera resumida las características estructurales de las proteínas de la cápside que interactúan con estos receptores.

2.1. Proteína VP4 de rotavirus

Como se ha comentado anteriormente, la proteína VP4 de RV se escinde proteolíticamente en sus dos dominios VP5* y VP8* (Figura 3), proceso necesario para la entrada del virus a la célula diana³¹. VP8* está implicada en la unión inicial a través de la interacción con receptores celulares mientras que VP5* interviene en la traslocación del virus al citoplasma de las células, promoviendo la infección^{32,33}.

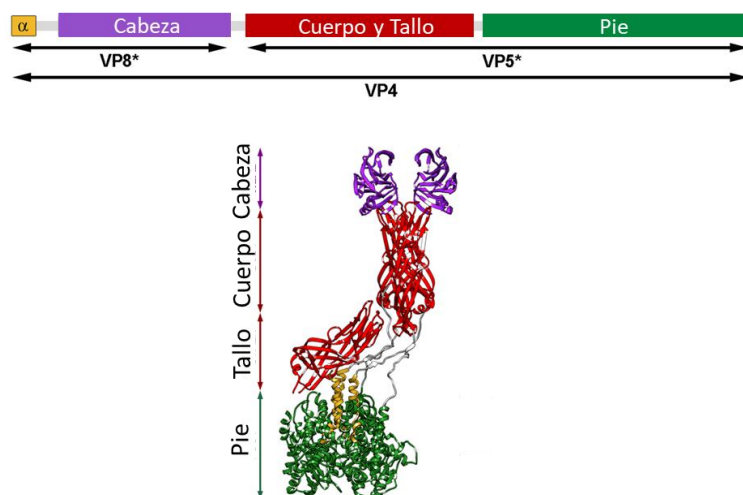


Figura 3. Modelo atómico de la espícula VP4 de rotavirus. Se muestra el diagrama de la organización de VP4 (arriba), codificado por colores según se indica. En la imagen de abajo se muestra la estructura atómica del trímero de VP4 correspondiente a la espícula de RV. La porción de la cabeza (VP8*) queda expuesta hacia el exterior de la partícula viral mientras que el pie (parte interior de VP5*) está unido a la proteína VP7 del virus. Adaptado de Rodríguez JM *et al.*, 2014³².

V. INTRODUCCIÓN

2.2. Proteína VP1 de norovirus

La proteína VP1 de la cápside de NoV está constituida por el dominio S y el dominio P. A su vez, el dominio P se divide en dos subdominios (P1 y P2). Tal y como se puede observar en la Figura 4, la región P2 queda expuesta hacia la parte más externa de la cápside viral y presenta los sitios de unión que interactúan con los receptores celulares.

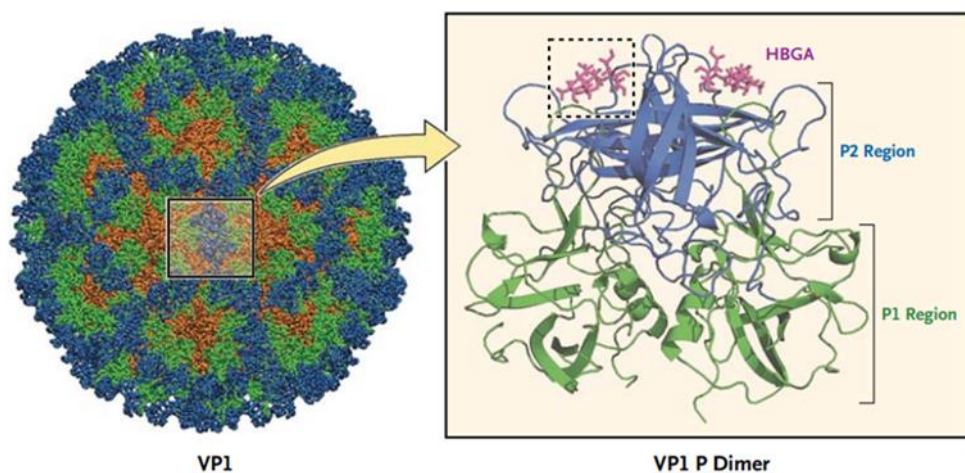


Figura 4. Estructura atómica del dominio P de la proteína VP1 de norovirus. Se muestra la estructura atómica de la cápside de la cepa prototipo de NoV (Norwalk). A la derecha, se presenta la estructura secundaria del dominio P de VP1. La región P2 (azul) está expuesta en la superficie de la proteína de la cápside y es el sitio donde los HBGAs (magenta) interactúan con el virión. Adaptado de Bok *et al.*, 2012³⁴.

Es importante mencionar que, a diferencia de RV, la ausencia de un modelo estable de cultivo de HuNoV ha implicado el desarrollo de distintas estrategias que han permitido ampliar los conocimientos acerca de la biología de este virus. Uno de los modelos de experimentación es la utilización de partículas P expresadas en *E. coli*. Estas partículas se forman a partir del autoensamblaje del dominio P de VP1. Retienen la capacidad de unirse a los receptores específicos de cada genotipo de NoV y son capaces de inducir la producción de anticuerpos bloqueantes³⁵. El otro se basa en la utilización de VLPs. Estas partículas se forman mediante el autoensamblaje de las proteínas VP1 y mantienen las mismas propiedades antigénicas y de adhesión que el virus nativo. Por lo general, se obtienen mediante la infección de células de insecto con baculovirus recombinantes³⁶.

2.3. Síntesis de antígenos del grupo histosanguíneo

Los HBGAs son carbohidratos complejos que están unidos a proteínas o lípidos en la superficie de los glóbulos rojos y al glicocáliz de las células epiteliales de la mucosa del

V. INTRODUCCIÓN

tracto respiratorio, genitourinario y digestivo, o como oligosacáridos libres en fluidos biológicos como la saliva o la leche materna³⁷.

Los HBGAs se sintetizan a partir de precursores mediante la adición paso a paso de monosacáridos, la cual está catalizada por un conjunto de glicosiltransferasas codificadas por tres familias principales de genes: *fut2* (estatus secretor), *fut3* (estatus Lewis o Le) y *ABO*. El gen *fut2* codifica una α -1,2 fucosiltransferasa (enzima FUT2), el gen *fut3* codifica una α -1,3 / α -1,4 fucosiltransferasa (enzima FUT3), mientras que la familia *ABO* codifica dos glicosiltransferasas, A o B (enzimas A y B)^{30,37}.

Existen diversos tipos de precursores, pero los más estudiados son los de tipo 1 y tipo 2. Estos precursores se diferencian por el tipo de enlace formado entre la galactosa y la N-acetyl-glucosamina, siendo de tipo β -1-3 en el caso de los antígenos de tipo 1 (precursor: lacto-N-biosa o LNB) o β -1-4 en el caso de los antígenos de tipo 2 (precursor: N-acetyl-lactosamina) (Figura 5). Las enzimas FUT2 y FUT3 van añadiendo L-fucosas a los diferentes azúcares (FUT3 a la N-acetyl-glucosamina y FUT2 a la galactosa). La presencia de al menos un alelo *fut2* funcional da lugar al fenotipo secretor y promueve la síntesis del antígeno H. Si es la enzima FUT3 la que modifica los precursores, se generan los antígenos Le^a (a partir del precursor de tipo 1) y Le^x (a partir del precursor de tipo 2). La enzima FUT3 también puede actuar sobre los antígenos H de tipo 1 y tipo 2, generando los antígenos Le^b y Le^y, respectivamente. A su vez, el antígeno H también actúa como sustrato de las enzimas A y B para formar los grupos sanguíneos A y B, respectivamente (Figura 5)^{30,37}.

Varias mutaciones en los genes *fut2* o *fut3* conducen a una ausencia total o una disminución de la función de las fucosiltransferasas correspondientes. La ausencia de antígenos fucosilados en α -1,2 y en α -1,3/4 en las superficies mucosas y en las secreciones determina el fenotipo no secretor y Lewis negativo, respectivamente³⁸.

Por lo tanto, estos polimorfismos genéticos regulan la presencia y ausencia de ciertos HBGAs, lo cual a su vez afecta a la interacción, susceptibilidad o resistencia a patógenos que reconocen elementos como moléculas de unión. De hecho, se ha descrito que existe un reconocimiento diferencial entre los diferentes HBGAs y los distintos

V. INTRODUCCIÓN

genotipos virales de NoV (subdominio P2 de la fracción P de VP1) y RV (porción VP8* de VP4)^{39,40}.

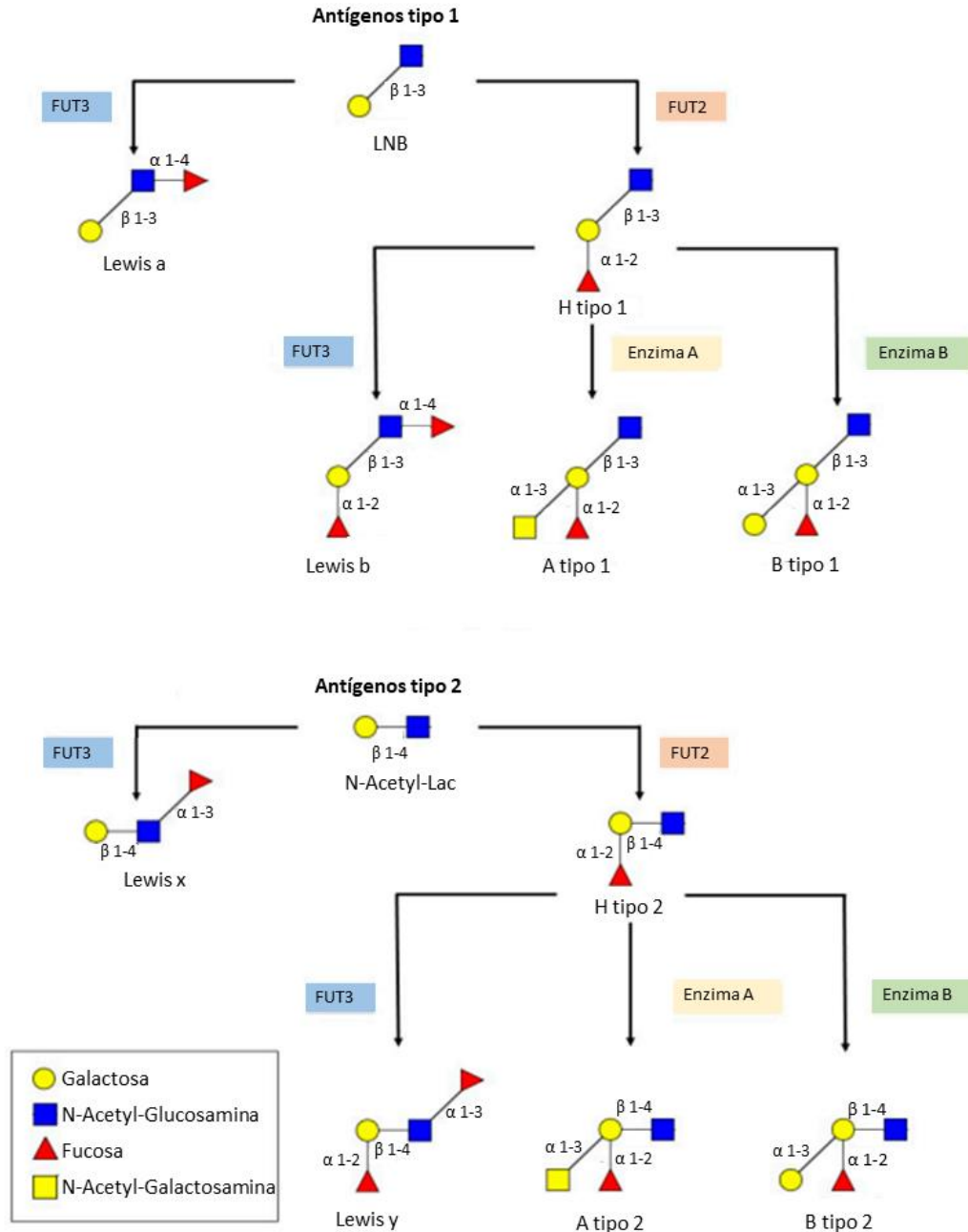


Figura 5. Ruta de biosíntesis de los antígenos del grupo histosanguíneo de tipo 1 y 2. Los precursores de tipo 1 y tipo 2 son elongados por FUT2, que añade fucosa en posición α-1,2 a la porción de galactosa, y por FUT3, que añade fucosa en posición α-1,3/4 a la N-acetil-glucosamina, para producir los antígenos H y Lewis, respectivamente. De manera similar, las enzimas A y B elongan las cadenas de azúcar al unir una N-acetil-galactosamina o una galactosa en posición α-1,3 a la porción de galactosa del antígeno H, produciendo los grupos sanguíneos A y B, respectivamente. Adaptado de Peña-Gil N *et al.*, 2021⁴¹.

V. INTRODUCCIÓN

2.4. Interacción entre antígenos del grupo histosanguíneo y virus entéricos

A pesar de la cantidad sustancial de investigaciones realizadas en los últimos años sobre los mecanismos de NoV y RV relacionados con la unión a las células hospedadoras, todavía existen diversas contradicciones y el proceso aún está lejos de ser completamente comprendido.

Estudios con RV de origen animal revelaron la interacción de VP8* con el ácido siálico (otro receptor celular), mientras que otros RV (de origen animal y humano) fueron independientes de este componente e interactuaron con HBGAs^{42,43}. La VP8* de los genotipos P[8], P[4], P[6], P[14], P[11] y P[19] reconocen los HBGAs de los individuos Se⁺. Respecto a los genotipos P[4] y P[8] de RV humano (HRV), los más detectados a nivel mundial, también hubo estudios contradictorios, ya que algunos determinaron que se unen tanto a Le^b como al H de tipo 1 (ambos del fenotipo secretor)⁴⁴⁻⁴⁷, mientras que otros informaron que no lo hacían a Le^b^{48,49}. Por último, se ha reportado que P[6] se une al antígeno H de tipo 1 pero no al Le^b^{46,50}. Experimentos con cristalografía de rayos X y técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) han permitido identificar diversos bolsillos de unión en la VP8* que intervienen en la interacción con diferentes regiones de los glicanos. En el caso del genotipo P[4], se identificó un bolsillo de unión en la VP8* para la interacción con la lacto-N-fucopentaosa I (Fuc- α -1,2-Gal- β -1,3-GlcNAc- β -1,3-Gal- β -1,4-Glc)^{48,51}. En el genotipo P[8], se identificó otro bolsillo para la unión de la lacto-N-biosa (precursor tipo 1) y del antígeno H de tipo 1⁴⁹. Según estos autores, este bolsillo hallado en la VP8* del genotipo P[8] no puede acomodar el antígeno Le^b, que contiene una L-fucosa adicional unida por un enlace α -1,4. Sin embargo, otros autores identificaron un segundo sitio de unión para Le^b en los genotipos P[4] y P[8]⁴⁵. Por lo tanto, los conocimientos actuales indican que estos dos genotipos virales poseen al menos dos sitios de unión a glicanos identificados, hecho que refleja una adaptación de los virus a diferentes polimorfismos de HBGAs en el hospedador.

Ante la dificultad del cultivo de NoV, la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha sobre la interacción de NoV y HBGAs han empleado los modelos de partículas P y VLPs. El virus prototipo Norwalk (genotipo GI.1) reconoce a los secretores de tipo A y H, pero no interactúa con los secretores de tipo B y no secretores. La cepa Va387 (genotipo

V. INTRODUCCIÓN

GII.4) se une a los secretores de tipo A, B y H; los genotipos GII.5 y GII.12 se unen a los secretores de tipo A y B; y el genotipo GII.9 reconoce a los Lewis, tanto a los secretores positivos (Le^b y Le^y) como a los no secretores (Le^a y Le^x)^{30,52}. En cuanto a las variantes GII.4 Den Haag 2006b y Sydney 2012, Carmona *et al.* demostraron que no reconocen ningún HBGA⁵³. En contraste, todas estas cepas podrían reconocer heparán-sulfato (proteoglicano de la superficie celular o matriz extracelular) o citrato, por lo que estos componentes también podrían desempeñar un papel en la patogénesis de NoV como receptores/cofactores celulares⁵⁴. Por otro lado, las VLPs de NoV GI.3 muestran una fuerte unión a los HBGA salivares del tipo A, una unión ligeramente menor a los HBGA salivares del tipo O y una unión débil o nula a los HBGA salivares del tipo B y AB⁵⁵.

En los últimos años, han ido surgiendo nuevos componentes del hospedador que juegan un papel importante en el reconocimiento e infección de virus entéricos⁵⁶. Por un lado, se ha demostrado que la bilis, producida por el hígado y secretada a la luz intestinal, es necesaria para la replicación de HuNoV, lo que depende además de la cepa viral⁵⁷. Dos estudios cristalográficos abordaron la unión de ácidos biliares a la proteína de la cápside de HuNoV y NoV murino (MNV)^{58,59}. Para cepas específicas de HuNoV, se identificaron dos bolsillos de unión simétricos para ácidos biliares con baja afinidad y adyacentes a los sitios de unión de HBGA⁵⁸. En el caso de GII.1 (genotipo poco frecuente), la unión de ácidos biliares promovió su unión a HBGA, mientras que con los genotipos GII.4 y GII.17 (virus más frecuentes) no se observó la unión del ligando a estos bolsillos. Sin embargo, la presencia de ácidos biliares aumentó la replicación de GII.4 en enteroides⁶⁰. Como vemos, la gran diversidad de genotipos y variantes de NoV aumenta la complejidad para extraer conclusiones claras acerca del reconocimiento del hospedador. Además, la comparación de estudios que han utilizado técnicas diferentes dificulta la obtención de conclusiones evidentes.

Hasta aquí hemos comentado diversas investigaciones realizadas sobre la interacción *in vitro* de los virus con los distintos HBGA. Por otro lado, varios estudios observacionales han investigado la asociación *in vivo* entre el estado secretor y la susceptibilidad a la infección por RV P[8] y NoV GII.4. Aunque se han encontrado algunas discrepancias⁶¹⁻⁶³, la mayoría de los informes han mostrado que el estatus secretor está

V. INTRODUCCIÓN

asociado con una mayor susceptibilidad a la infección por estos virus^{64–69}. Las razones de estas discrepancias son desconocidas, pero podrían estar relacionadas con varias causas, incluidas las diferencias entre las variantes de GII.4 (en el caso de NoV), la influencia de otros cofactores involucrados en el reconocimiento (como por ejemplo la bilis), la presencia de un fenotipo de secreción débil (heterocigoto para *fut2*) y el estado de salud general, el cual está favorecido, entre otros factores, por una eficiente respuesta inmune y una elevada riqueza y diversidad de la microbiota intestinal.

3. Interacción entre el hospedador y la microbiota

Se sabe que la microbiota intestinal es muy importante para el estado de salud general del hospedador, ya que un desequilibrio en la composición de ésta (disbiosis) se ha relacionado con diversos tipos de enfermedades^{70,71}. Una microbiota intestinal sana se caracteriza por presentar una elevada riqueza y diversidad de especies, por su capacidad de resistir perturbaciones (estabilidad y resistencia) y ser capaz de volver al estado previo a la perturbación (resiliencia). A su vez, la composición microbiana está influenciada por diversos factores como son la dieta, infecciones e inflamación y otros elementos entre los cuales se encuentra la genética del hospedador.

Las bacterias comensales no sólo obtienen nutrientes a través de la dieta sino también de los glicanos que están en el tracto gastrointestinal, como por ejemplo la L-fucosa de los HBGAs fucosilados⁷². En un estudio publicado en 2014, los investigadores vieron que, tras una infección sistémica producida en ratones, se produjo un aumento rápido de la fucosilación intestinal mediada por la microbiota, desencadenando el crecimiento de bacterias comensales beneficiosas y ayudando al mantenimiento de la simbiosis hospedador-microbiota⁷³. Las bacterias beneficiosas no son las únicas que aprovechan el estado de fucosilación. Ciertos patógenos también son capaces de diseminarse aprovechándose de los glicanos presentes en el intestino. En otro estudio publicado en 2013, los autores vieron que ciertos patógenos entéricos (*Salmonella typhi* y *Clostridioides difficile*) se diseminaron al aprovechar los azúcares liberados por las bacterias comensales una vez fueron eliminadas estas últimas tras el tratamiento con antibióticos⁷⁴.

V. INTRODUCCIÓN

Por otro lado, no sólo los factores genéticos del hospedador contribuyen a la modulación de la composición microbiana. Tras el acontecimiento de alguna perturbación en el ecosistema intestinal (infección, inflamación o tratamiento con antibióticos, entre otros), algunos de los miembros de la microbiota comensal, que previamente están en baja concentración relativa (patobiontes), ven favorecida su expansión y pueden contribuir, a su vez, a la afectación de la diversidad microbiana y causar patología⁷⁵. Los patobiontes que surgen bajo condiciones inflamatorias contribuyen a la perpetuación de la inflamación, preservando así las condiciones que favorecen su propio crecimiento⁷⁶. Además, la infección por diversos patógenos entéricos (entre los que se encuentran los virus) también inducen una respuesta inflamatoria en el hospedador, la cual, a su vez, afecta al restablecimiento de la microbiota comensal⁷⁷. Sin embargo, también es posible que la microbiota ejerza el efecto contrario sobre la respuesta inmune. Uno de los componentes bacterianos que influyen sobre el sistema inmunitario es el lipopolisacárido (LPS) presente en algunos miembros de la microbiota intestinal (bacterias Gram negativas). Este componente puede contribuir a la modulación de la respuesta inflamatoria de manera positiva (LPS proinflamatorio) o negativa (LPS antiinflamatorio), dependiendo del microorganismo y tipo de LPS. En general, se cree que el LPS microbiano intestinal es uno de los activadores más potentes de la señalización inmune innata y un mediador importante de la influencia de la microbiota en la fisiología del huésped. Publicaciones anteriores han demostrado que diferentes estructuras del lípido A (región más interna del LPS embebida en la membrana externa) producidas por algunas especies bacterianas interfieren con la señalización adecuada del complejo formado por el receptor tipo toll 4 y el factor de diferenciación mieloide 2 (TLR4/MD2, por sus siglas en inglés), el cual es importante en el reconocimiento de LPS. Esta interferencia da lugar a una disminución de la respuesta inflamatoria, afectando a la protección del hospedador frente a la infección de determinados patógenos^{78,79}. d'Hennezel *et al.* revelaron que una actividad inmunoinhibitoria del LPS, conservada en los miembros del orden *Bacteroidales*, silenció la señalización del TLR4, con la consiguiente disminución de citocinas proinflamatorias dependientes de este receptor (IL10, IL6, IL8, TNF α , IL12p70, y IL1 β) para todo el consorcio de organismos que habitan el intestino humano. Estos investigadores también

V. INTRODUCCIÓN

observaron una inhibición del TLR2 por parte de *Bacteroides* spp. cuando incubaron el LPS de esta bacteria con zimosano, un potente activador de TLR2⁸⁰. Resultados similares fueron obtenidos en otros estudios. Vatanen *et al.* demostraron que el LPS de *B. dorei* presentaba estructuras del lípido A tetra- y penta-aciladas, a diferencia del lípido A hexa-acilado que se encuentra en *E. coli*. Además, el LPS de *B. dorei* inhibió la estimulación inmunológica y las respuestas de citoquinas inflamatorias producidas por el LPS de *E. coli* en células humanas⁸¹. Por otro lado, Pither *et al.* resolvieron la estructura del LPS de *Bacteroides thetaiotaomicron* y determinaron que era diferente al LPS del enteropatógeno *Salmonella typhimurium*. Además, estos autores también observaron que el LPS de *B. thetaiotaomicron* produjo un efecto más débil en la activación del TLR4 en comparación con el LPS de *S. typhimurium*. Sin embargo, a diferencia del estudio de d'Hennezel *et al.*, el LPS de *B. thetaiotaomicron* fue capaz de activar la señalización dependiente de TLR2, en contraste con el LPS de *S. typhimurium*⁸².

Como vemos, en el nicho intestinal se produce toda una serie de interacciones entre los microorganismos y el hospedador que da lugar a la alteración de la composición bacteriana. En ocasiones, estas interacciones provocan una especie de bucle de retroalimentación negativa en el que, por un lado, la activación de la respuesta inmune inflamatoria favorece el aumento de microorganismos que estimulan a su vez dicha inflamación, afectando en última instancia al restablecimiento de la microbiota original. Por otro, y de la misma manera, la inhibición de la respuesta inmune por parte de algunos microorganismos podría ser aprovechada por otros patógenos, como por ejemplo los virus entéricos.

4. Interacción entre la microbiota y los virus entéricos

De la misma manera que las infecciones por patógenos entéricos influyen sobre la diversidad de la microbiota intestinal (a través de la modulación del sistema inmune y la modificación del estado de glicosilación, entre otros), la presencia de determinados taxones bacterianos influye sobre la susceptibilidad del hospedador a la infección por RV y NoV.

En la Figura 6 se muestra un resumen de los diferentes mecanismos mediados por la microbiota que podrían influir sobre la accesibilidad de los virus a las células diana⁸³.

V. INTRODUCCIÓN

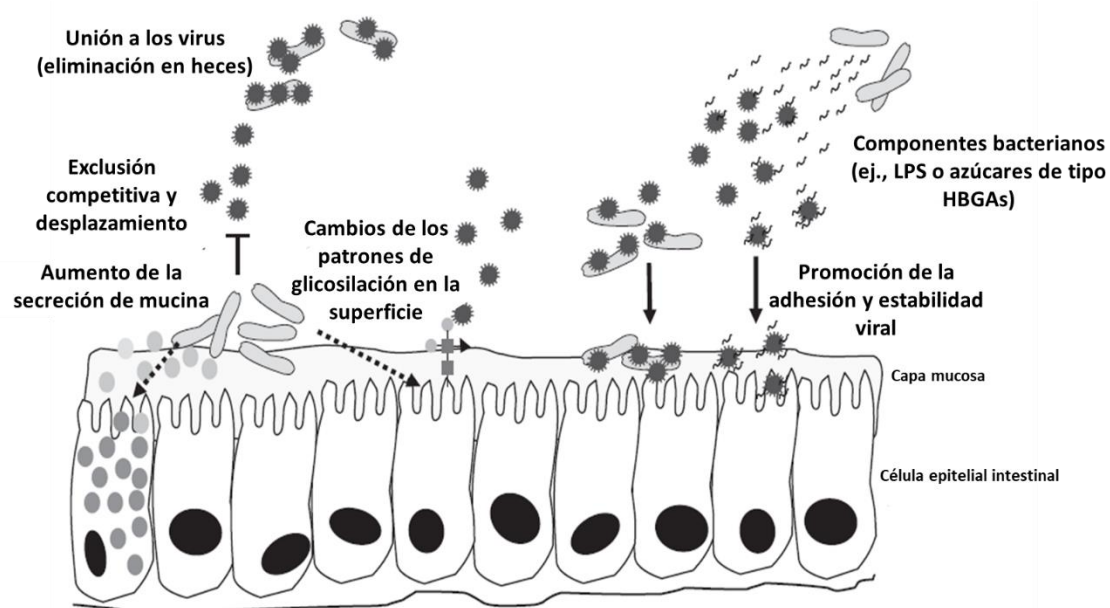


Figura 6. Posibles interacciones de la microbiota intestinal con los virus entéricos. La microbiota intestinal puede promover o inhibir la infección viral influyendo sobre el acceso de los virus a las células huésped. LPS: lipopolisacárido. Adaptado de Monedero V & Rodríguez-Díaz J, 2016 ⁸³.

Por un lado, la unión a las bacterias o a sus componentes solubles (exopolisacárido o EPS, flagelina, LPS o moléculas similares a los HBGAs) puede favorecer la eliminación de los virus al ser arrastrados a través de las heces o bien estabilizar su adhesión a la mucosa y facilitar su transcitosis. Además, la microbiota presente en el nicho intestinal puede estimular la producción de mucosa o degradarla, influyendo así en el acceso de los virus a las células epiteliales. También pueden modificar el estado de glicosilación de la mucosa y afectar positiva o negativamente a la adhesión viral.

Por otro lado, un intestino sano está caracterizado, entre otros factores, por la presencia de una microbiota diversa y homogénea. Tras una perturbación del ecosistema intestinal, la composición microbiana se ve alterada, de manera que se activan diversos mecanismos entre los que se encuentra la respuesta inmune. En este sentido, la microbiota no sólo influye directamente sobre la accesibilidad de los virus a las células hospedadoras. Los virus entéricos también se ven influenciados indirectamente por la respuesta iniciada en el nicho intestinal y, la activación del sistema inmune por parte de la microbiota, dando lugar a la liberación de citocinas, anticuerpos IgA o a la movilización de células inmunes que, en última instancia, afectan a la infección viral (Figura 7).

V. INTRODUCCIÓN

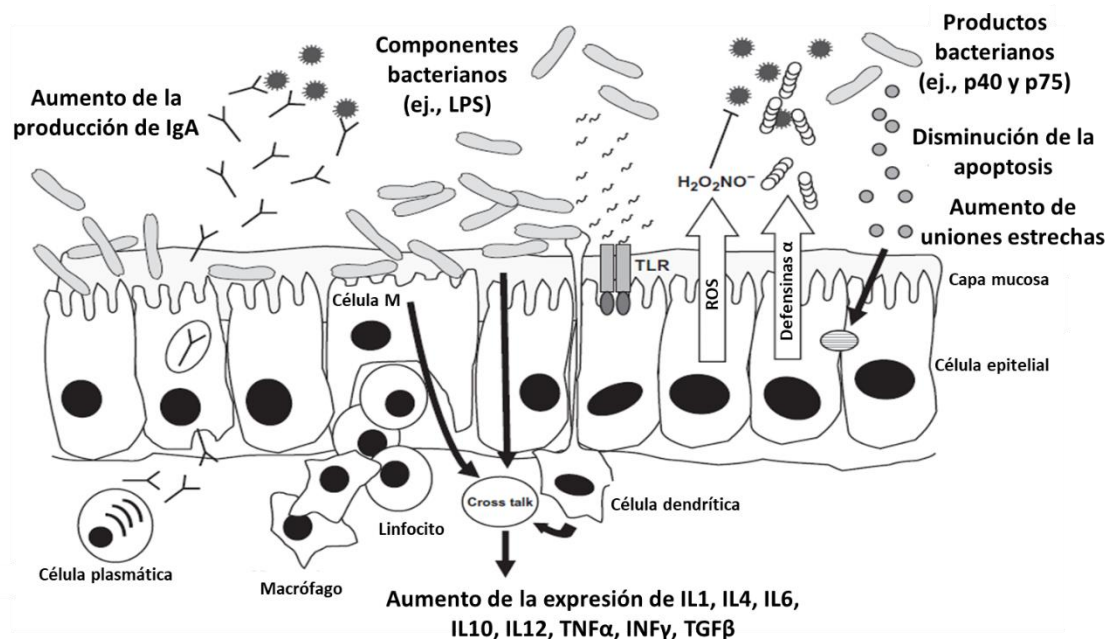


Figura 7. Efectos sobre la infección viral influenciados por la interacción cruzada entre la microbiota y el hospedador. La microbiota intestinal puede inducir la activación de la respuesta inmune, la cual puede afectar a la infección viral de forma indirecta. Adaptado de Monedero V & Rodríguez-Díaz J, 2016⁸³.

Como hemos visto, la susceptibilidad a la infección viral no sólo se ve influenciada por los factores genéticos del huésped. Si se tiene en cuenta el nicho en el que se desarrolla la infección, es importante considerar todos los factores que participan en ese ecosistema. Una población grande y diversa de microorganismos comensales que incluye bacterias, virus, hongos y parásitos habita el tracto gastrointestinal. NoV y RV, al ser patógenos entéricos, interactúan con ellos, lo que resulta en efectos beneficiosos o perjudiciales para el huésped. La coevolución de la microbiota comensal y su huésped ha resultado en una condición mutuamente beneficiosa en la que el huésped puede beneficiarse de las regulaciones fisiológicas, metabólicas e inmunológicas proporcionadas por la microbiota, mientras que la microbiota comensal depende absolutamente del huésped para la adquisición de nutrientes y sitios de propagación. En la regulación de la infección viral, la microbiota comensal puede promover efectos inhibidores o favorecedores de la infectividad viral a través de diversos mecanismos⁸⁴⁻⁸⁸.

No ha sido hasta hace relativamente poco que los investigadores han tenido en cuenta el papel de la microbiota en la infectividad viral. Fruto de esta consideración, se ha generado una serie de investigaciones relacionadas con el efecto de diversos taxones

V. INTRODUCCIÓN

sobre la infección de virus entéricos. A continuación, se muestran algunos ejemplos de la literatura científica relacionados con la permisibilidad y restricción de la infección por RV y NoV.

4.1. La microbiota y los virus entéricos: estudios *in vitro* y en el modelo animal

La mayoría de las conclusiones extraídas sobre este tema deriva del estudio con células cultivadas y en diversos modelos animales. Además, el uso de partículas P y VLPs de NoV ha resultado una herramienta muy útil para la investigación sobre la biología de este patógeno. A continuación, se describen algunos ejemplos sobre la relación entre la microbiota y el efecto sobre la adhesión o infección viral.

4.1.1. La microbiota restringe la infección de virus entéricos

Como se ha comentado anteriormente, las bacterias pueden proteger al huésped de la infección viral al modular la composición de la microbiota, mejorar la función de la barrera intestinal y promover la inmunidad de la mucosa⁸⁹. Además, las bacterias interfieren con la unión del virus a sus células diana mediante diferentes estrategias. La presencia previa de determinadas bacterias en el epitelio intestinal puede impedir la adhesión de los virus a las células (exclusión). En el lumen, los virus pueden quedar adheridos a la superficie bacteriana y ser eliminados con las heces (exclusión competitiva) y, además, la unión de los virus a la mucosa intestinal puede ser desplazada posteriormente debido a la mayor interacción con las bacterias cercanas (desplazamiento)⁸³.

El término “probiótico” ha sido atribuido a aquellos microorganismos vivos que, administrados en la cantidad adecuada, confieren efectos beneficiosos para la salud. Varios estudios demuestran el efecto beneficioso de las bacterias probióticas no solo contra las infecciones virales entéricas sino también frente a muchos otros patógenos^{90–93}. Diversas bacterias han sido catalogadas como probióticas por sus efectos positivos sobre la salud intestinal. En cuanto a RV, parece que *E. coli* Nissle 1917 reduce la diarrea en cerdos gnotobióticos al modular una respuesta inmunológica^{94–97} y, tras su administración, se redujo la gravedad de la diarrea y la eliminación de HRV en cerdos debido a diversos mecanismos: por aumentar los niveles de IL6 y IL10 (citocinas inductoras de IgA) y por su interacción directa con las partículas de RV⁹⁶. Además,

V. INTRODUCCIÓN

también se demostró que esta bacteria restauró los efectos de la administración del antibiótico ciprofloxacino, aumentando la expresión de células enteroendocrinas y de los enterocitos, lo que implica que el probiótico contribuyó a mejorar la barrera intestinal y mantuvo la función de absorción del intestino^{94,95}.

Por otro lado, la flagelina bacteriana presente en esta bacteria (y muchas otras) contribuye a la restricción de la infección por RV a través de la activación del receptor TLR5 (reconoce flagelinas bacterianas) y del receptor tipo NOD (NLR, por sus siglas en inglés) presente en el inflamasoma NLR-C4 (reconoce patrones citoplasmáticos moleculares asociados a patógenos). Estos receptores son cruciales para la producción de IL22 e IL18, respectivamente, las cuales son importantes en la protección contra RV⁹⁸. En los estudios realizados por Schnepf *et al.*, también se estableció un papel fundamental para la IL22 inducida por la microbiota en sus efectos limitantes contra la infección por RV. Se demostró que la eliminación de la microbiota resultó en una producción reducida de IL22 y que la protección contra RV se puede lograr mediante la administración de esta interleucina⁹⁹.

Otros estudios también han determinado el papel de taxones bacterianos específicos de la microbiota intestinal en la replicación por RV. Shi *et al.* descubrieron que la elevada resistencia a RV murino (MRV) de ciertas colonias de ratones *Rag1*^{-/-} (que carecen de linfocitos B y T) se debía a niveles elevados de colonización por *Candidatus arthromitus*. Cuando infectaron ratones inmunocompetentes libres de microbiota con MRV, la infección fue bloqueada cuando fueron colonizados con esta bacteria. *C. arthromitus* es miembro de las bacterias filamentosas segmentadas (SFB, por sus siglas en inglés), que son típicas en los ratones, pero pueden alcanzar números elevados en la cepa inmunocomprometida *Rag1*^{-/-}. Las SFB participaron en la exclusión de MRV de los ratones mediante procesos que involucran el contacto directo entre el virus y las bacterias. Además, la colonización del íleon por SFB indujo cambios en la expresión génica del huésped y aceleró el recambio de las células epiteliales, lo que pudo favorecer también la eliminación de las células infectadas por MRV¹⁰⁰ (Figura 8).

V. INTRODUCCIÓN

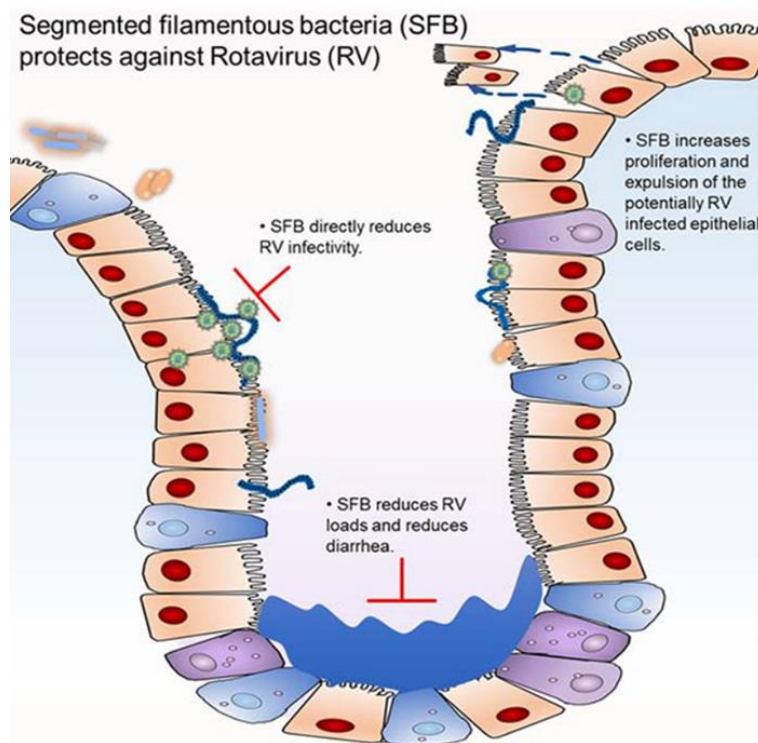


Figura 8. Resumen del sistema de protección del hospedador promovido por *Candidatus arthromitus* frente a la infección por rotavirus murino. Extraída de Shi et al., 2019¹⁰⁰.

Respecto a NoV, se ha demostrado que la coincubación del probiótico *Bifidobacterium adolescentis* con la cepa MNV-1 disminuye la infección en cultivo celular. Esta inhibición no ocurrió en la etapa de unión viral, ya que no se observaron diferencias en el número de copias genómicas de MNV-1 recogidas de las células lavadas, con y sin *B. adolescentis*, después de una co-incubación de 1 hora a temperatura ambiente. En este estudio también demostraron que este probiótico bloquea la unión de las VLPs de la cepa Norwalk (genotipo GI.1) a las células epiteliales (Caco-2 y HT-29) pero no la de las VLPs de la cepa GII.4 Dijon 1996 (Caco-2)¹⁰¹. De manera similar, *Lactobacillus casei* y *E. coli* Nissle 1917 dificultan la unión de las partículas P de genotipo GI.1 a las células HT-29¹⁰². En otro estudio, cerdos gnotobióticos colonizados con *Lactobacillus rhamnosus* GG y *E. coli* Nissle 1917 fueron infectados con HuNoV GII.4 (variante 2006b), y se observó una excreción fecal del virus por debajo del límite de detección, lo que indica una inhibición significativa de la infección por HuNoV debido a la colonización de estas bacterias¹⁰³. Como hemos comentado anteriormente, la dieta es uno de los factores que modulan la microbiota intestinal. Estudios con MNV sugieren que los suplementos de vitamina A tienen un efecto antiviral tanto *in vitro* como *in vivo* sobre

V. INTRODUCCIÓN

MNV mediados por *Lactobacillus* spp. Lee *et al.* mostraron un aumento de la población de *Lactobacillus* spp. intestinal en ratones después de la infección con suplementación con vitamina A, y se postuló que los efectos antivirales de estas bacterias contribuyen a la reducción de la infección por NoV¹⁰⁴.

Parece ser que miembros específicos de la microbiota poseen rasgos restrictivos para la infección viral entérica, al menos en el caso de RV, porque la evidencia para NoV es más débil. Análisis más recientes y detallados con ratones tratados con antibióticos muestran que, si bien la microbiota potencia la infección de la cepa murina MNV-1 en las regiones distales del intestino (íleon y colon), restringe la infectividad en el intestino delgado proximal (duodeno y yeyuno)¹⁰⁵. Esta regionalización de los efectos está mediada por una abundancia distinta de receptores de ácidos biliares dependiendo de la ubicación intestinal, los cuales están involucrados en desencadenar una respuesta antiviral de interferón (IFN) contra NoV que es mejorada por las bacterias en el intestino proximal. La modificación microbiana de los ácidos biliares en el intestino delgado tiene un efecto sobre la infección por MNV en diferentes ubicaciones del intestino. La inoculación a animales tratados con antibióticos con *Clostridium scindens*, una bacteria conocida por transformar los ácidos biliares primarios en ácidos biliares secundarios (que están disminuidos en los animales tratados con antibióticos), restauró la inhibición viral en el intestino delgado proximal, aunque no potenció la infección en el intestino distal¹⁰⁵.

La regulación inmunológica está emergiendo como el mecanismo subyacente de este fenómeno y se extiende a virus que no tienen como órgano diana el intestino. En este sentido, se han descrito taxones bacterianos específicos en la prevención de enfermedades virales como la infección sistémica por el virus de la encefalomiелitis miocárdica (EMCV) en ratones, donde el tratamiento con antibióticos exacerbó la infección¹⁰⁶. A diferencia de otras bacterias intestinales probadas, se identificó a *Blautia coccoides* (un antiguo miembro del género *Ruminococcus*) entre los miembros de la microbiota intestinal como una bacteria capaz de restringir la replicación sistémica de EMCV en ratones monocolonizados. En animales que portaban *B. coccoides*, se restableció la capacidad de los macrófagos para inducir IFN, que protege contra EMCV¹⁰⁶.

V. INTRODUCCIÓN

El IFN de tipo I desempeña un papel fundamental en la respuesta contra patógenos virales. La falta de bacterias conduce a una respuesta inmunológica innata más débil, que se caracteriza por una baja expresión de IFN, lo cual dificulta una respuesta antiviral efectiva de los macrófagos¹⁰⁷. Varios componentes bacterianos o metabolitos derivados están involucrados en la estimulación de la inmunidad innata del huésped contra virus respiratorios mediante la producción de IFN, como los lipo-oligosacáridos (LOS, LPS sin antígeno O) de algunas especies de *Bacteroides* en la infección por influenza, o el acetato (y propionato o butirato) del metabolismo microbiano intestinal, que por sí solo es capaz de inducir una respuesta de IFN en los pulmones de ratones y protegerlos del virus respiratorio sincitial (VRS) cuando se suplementa en el agua de bebida¹⁰⁸.

Como ya hemos comentado anteriormente, otras formas en las que los miembros de la microbiota podrían mediar en la protección frente a RV incluyen la unión directa de partículas de RV a bacterias, como se ha hipotetizado para las SFB¹⁰⁰, o como se ha descrito para algunos probióticos. Estas interacciones pueden ser promovidas por moléculas similares a HBGAs que pueden estar presentes en las superficies bacterianas¹⁰⁹. En este estudio demostraron que las VLPs de NoV se unían principalmente al EPS de *Enterobacter* sp. SENG-6, donde se localizaban las sustancias similares a HBGAs. Confirmaron mediante análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA, por su siglas en inglés) que el EPS purificado de *Enterobacter* sp. SENG-6 unía VLPs de NoV GI.1 y GII.6, las cuales reconocen el antígeno A, pero no unió una cepa mutante GI.1 que pierde la capacidad de unirse al antígeno A. La escisión enzimática de residuos terminales de N-acetil-galactosamina en el EPS bacteriano debilitó la unión de las VLPs de NoV GI.1. Estos resultados indican que las sustancias similares al antígeno A en el EPS de esta bacteria desempeñan un papel clave en la unión de VLPs de NoV¹⁰⁹.

Como vemos, las consecuencias derivadas de esta interacción pueden diferir entre diversos grupos de virus y, mientras que algunos virus se ven perjudicados debido a su secuestro en la superficie bacteriana y/o por la competencia por los receptores virales presentes en las células huésped, algunos virus entéricos, como NoV o poliovirus, pueden beneficiarse de ellas mediante el aumento de la estabilidad del virión o facilitando la unión a sus células diana^{110–112}.

V. INTRODUCCIÓN

4.1.2. La microbiota promueve la infección de virus entéricos

A pesar de la evidencia significativa disponible sobre el papel de las bacterias intestinales en la inhibición de infecciones virales, algunas investigaciones argumentan a favor de un papel de la microbiota en la promoción de la infección viral¹¹³. Esto fue demostrado por primera vez por Kuss *et al.*¹¹⁰ y Kane *et al.*¹¹⁴ al utilizar poliovirus, reovirus y el virus del tumor mamario de ratón (MMTV, por sus siglas en inglés) para infectar ratones libres de microorganismos o tratados con antibióticos. En estos casos, se observó que se producía una atenuación sustancial de la infección en comparación con la infección en ratones colonizados por microbios. La reconstitución de microorganismos intestinales en ratones tratados con antibióticos fue suficiente para restaurar la patogénesis del poliovirus¹¹⁰. Además, los títulos intestinales de reovirus se redujeron sustancialmente en ratones tratados con antibióticos en comparación con los ratones control¹¹⁴.

Recordemos que la microbiota intestinal puede facilitar directamente la replicación de virus entéricos mediante varios mecanismos, que incluyen la estabilización de los viriones y la promoción de la unión del virus a los receptores de las células huésped (Figura 6)^{111,112}. Varios virus entéricos que se benefician de la microbiota se unen a los polisacáridos de la superficie bacteriana, lo que resulta en una mayor infectividad viral y patogénesis. Cuando el poliovirus y otros miembros de la familia *Picornaviridae* se combinan con el LPS, su estructura exhibe una mayor estabilidad, tanto en términos de resistencia a altas temperaturas como a la exposición a lejía diluida¹¹⁵. Además, el LPS también puede promover la unión del poliovirus a la superficie de las células diana al facilitar la unión viral a su receptor¹¹⁶.

Respecto a RV y NoV, diversos estudios informaron sobre la disminución de la infección en ratones tratados con antibióticos^{111,117}. Cuando se infectaron ratones tratados con antibióticos con MRV, se observó una disminución del 42 % en el título viral¹¹⁷. Según Fenaux *et al.*, durante la replicación viral, una mayor proporción de las hebras de ARN positivas se utiliza para la traducción mientras que una menor proporción de las hebras de ARN negativas se aprovecha para la generación de la progenie¹¹⁸. Puesto que esta proporción no cambió en los ratones tratados con antibióticos, Uchiyama *et al.*

V. INTRODUCCIÓN

asumieron que los antibióticos afectaron a la entrada del virus a las células y no a la replicación. Concluyeron que la presencia de bacterias en los ratones no tratados con antibióticos favoreció la replicación¹¹⁷, posiblemente por la estabilización de la adhesión del virus a las células epiteliales.

En cuanto a NoV, experimentos realizados en cerdos gnotobióticos trasplantados con microbiota intestinal humana mostraron que la replicación de la variante GII.4/2006b de HuNoV fue estimulada por la microbiota, lo que aumentó los títulos de excreción y su duración¹¹⁹.

También se han detectado carbohidratos similares a los HBGAs en la superficie de distintas bacterias como por ejemplo *Enterobacter cloacae*, algunas cepas de *E. coli* y *Helicobacter pylori*^{111,120,121}. Esta característica se ha relacionado con las interacciones directas de NoV con miembros de la microbiota intestinal^{109,111,112}. *In vitro*, HuNoV es capaz de infectar células B en presencia de bacterias recubiertas con HBGAs. Las heces filtradas que contenían el virus GII.4 Sydney 2012 mostraron una restauración de la infectividad sobre las células B cuando las heces fueron coincubadas con *E. cloacae* antes de inocular la monocapa celular (exclusión competitiva), lo que sugiere que la unión de las partículas virales a las bacterias recubiertas con HBGAs permite la captación del virus en las células del huésped¹¹¹. También se observó que algunas cepas de *E. coli* que expresan HBGAs favorecen la estabilidad de las VLPs de NoV durante el tratamiento térmico, como el realizado durante el procesamiento de alimentos, por lo que puede facilitar su transmisión a través del consumo de alimentos contaminados¹¹².

Por último, otro de los aspectos comentados anteriormente es que las bacterias pueden favorecer la infección de virus entéricos de manera indirecta, al alterar la respuesta inmunológica antiviral (Figura 7). La infección oral por reovirus en ratones deficientes en IFN, característica que los hacen más susceptibles a la infección sintomática, disminuyó cuando fueron tratados con antibióticos¹¹⁰. Por otro lado, el MMTV también puede unirse al LPS, dando lugar a la estimulación del receptor TLR4 e iniciando una vía de señalización que resulta en la producción de la citocina inmunosupresora IL10, lo que sugiere que el aumento en la expresión de esta citocina genera un entorno tolerógeno que permite la persistencia viral¹²².

V. INTRODUCCIÓN

Hasta la fecha, son pocos los estudios que han abarcado la relación entre la estimulación del sistema inmune por la microbiota y el aumento de la interacción por RV y NoV. En un experimento con cerdos gnotobióticos trasplantados con heces humanas e infectados con la cepa G1P[8] de HRV, se demostró que los cerdos alimentados con una dieta deficiente en proteínas mostraron mayores niveles de excreción viral en las heces que los cerdos con una dieta normal. Curiosamente, los cerdos con dieta deficiente presentaron mayor abundancia de especies de *Proteus* y *Enterococcus* en el intestino a los siete días de la infección, mientras que, en las heces del mismo grupo, la abundancia de estos taxones fue menor. Además, en sus análisis de correlación entre la abundancia de estos géneros y distintos moduladores inmunes observaron que, en las heces, estos géneros correlacionaron fuertemente y de manera negativa con parámetros proinflamatorios (TNF α , IL17 e IL22) mientras que, a nivel de intestino, la correlación fue positiva. *Proteus* spp. fue significativamente más abundante en el intestino superior (duodeno y yeyuno) y en los tejidos sistémicos (bazo y nódulos linfáticos del mediastino) en el grupo de cerdos con dieta deficiente después de la infección con HRV¹²³. Las especies de *Proteus* (por ejemplo, *P. mirabilis*) se consideran patobiontes y se ha observado que son muy abundantes en la enfermedad inflamatoria intestinal^{124,125}. Una mayor abundancia de *Proteus* spp. en huéspedes desnutridos se ha asociado con inflamación intestinal, disbiosis y mayor riesgo de infecciones sistémicas^{125,126}. Por último, en un experimento con ratones tratados con antibióticos demostraron que la erradicación de la microbiota previene la infección persistente de la cepa CR6 de MNV, la cual se vio restaurada tras el restablecimiento de la microbiota bacteriana. En este estudio se sugirió que la microbiota intestinal limita la inmunidad innata dependiente de IFN, lo que permite la persistencia de MNV en el intestino¹²⁷.

4.2. La microbiota y los virus entéricos: estudios en humanos

Muy pocos estudios se han ocupado de las relaciones entre la microbiota intestinal y la infección por virus entéricos en humanos. La mayoría de los resultados que vinculan diferentes taxones bacterianos con la infección viral se derivan de ensayos de vacunación, en los que se han relacionado los análisis de la microbiota intestinal con los resultados de las vacunas (por ejemplo, las vacunas de RV).

V. INTRODUCCIÓN

La composición de la microbiota difiere entre individuos debido a múltiples factores, tales como la nutrición, el sexo, la edad, la genética y el estado general de salud. Además, se ha demostrado que estos factores exhiben notables diferencias entre países de bajos ingresos y naciones desarrolladas^{128,129}. Estas diferencias podrían ser algunas de las razones por las cuales las vacunas tienen una eficacia significativamente menor en los países de bajos ingresos^{23,130}. Sin embargo, otra razón importante que podría explicar estas diferencias está relacionada con la prevalencia de individuos Lewis negativos en Asia, América Latina y países africanos^{131,132}, donde el genotipo P[6] de RV es prevalente y, además, se ha establecido que reconoce a estos antígenos^{50,133}. Además, las vacunas de RV no incluyen este genotipo, circunstancia que también podría influir sobre su menor eficacia en esas áreas.

Como ya se ha comentado, las vacunas de RV han reducido drásticamente la morbilidad y mortalidad de la gastroenteritis aguda causada por la infección por RV⁵. Sin embargo, es relevante investigar los mecanismos implicados en la menor eficacia de estas vacunas, dado que incluso pequeñas mejoras en su efectividad tendrían el potencial de preservar la vida de cientos de miles de niños en los próximos años. Aunque no se comprenden completamente las razones de las variaciones en la eficacia, se cree que se deben a diferencias en las coinfecciones con otros enteropatógenos en el momento de la vacunación (por el tipo de respuesta inmune estimulada), en la composición de la microbiota intestinal y en el tipo de HBGAs¹²⁸.

En 2017 se publicaron dos estudios realizados por el mismo grupo en dos zonas donde la eficacia de la vacuna es menor (Ghana y Pakistán) mediante el análisis de la microbiota de niños vacunados con Rotarix®. Además, se comparó también la composición de la microbiota con niños de una población holandesa, donde la eficacia de la vacuna es considerada elevada. El objetivo era dilucidar las diferencias en la microbiota intestinal (mediante secuenciación del ADN ribosomal 16S o ADNr 16S) entre los respondedores y no respondedores, característica relacionada con la efectividad y no efectividad de la vacuna, respectivamente. Recordemos que Rotarix® consta de una sola cepa atenuada de origen humano (G1P[8])¹⁸.

V. INTRODUCCIÓN

Harris *et al.* demostraron que la microbiota intestinal difiere significativamente entre los respondedores y no respondedores a la vacuna^{134,135}. Se consideraron respondedores a aquellos individuos con un título de anticuerpos IgA anti-RV igual o mayor a 20 UI/ml después de la vacunación. El estudio de Ghana encontró que los niños que respondieron a la vacuna tenían abundantes recuentos de bacterias del filo *Bacillota*, especialmente *Streptococcus bovis*, mientras que los no respondedores presentaban números abundantes de bacterias del filo *Bacteroidota*, específicamente especies de los géneros *Bacteroides* y *Prevotella*. Además, el estudio mostró que la relación Enterobacterias/*Bacteroidota* fue significativamente mayor en los respondedores a la vacuna en comparación con los no respondedores. Además, los respondedores tenían más similitudes en la composición de la microbiota con niños holandeses sanos (no vacunados pero considerados como supuestos respondedores a las vacunas, de acuerdo con datos de ensayos clínicos que demuestran una tasa de seroconversión a las vacunas superior al 90 % en países del norte de Europa)^{18,19} que con los no respondedores¹³⁴. En la investigación realizada con lactantes paquistaníes también concluyeron que la microbiota variaba significativamente entre los respondedores y no respondedores a Rotarix®. Determinaron que la abundancia relativa de bacterias Gram negativas como *Serratia* spp. y *E. coli* se correlacionaba positivamente con la respuesta a la vacuna en comparación con los no respondedores¹³⁵. Los investigadores hipotetizaron que las variaciones en la eficacia de la vacuna podrían deberse a la presencia en mayor cantidad de *Bacteroides* spp. en los no respondedores, ya que, como se mencionó previamente, estos tienen un tipo de LPS distinto al de las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Se ha demostrado que el LPS de las especies de *Bacteroides* inhibe la estimulación de citocinas inflamatorias *in vitro* utilizando el LPS de *Enterobacteriaceae* como referencia^{80,81}. De manera similar, una abundancia relativa de bacterias productoras de flagelina, como por ejemplo las enterobacterias *E. coli* y *Serratia* spp., puede mejorar las respuestas inmunitarias innatas y adquirida a las vacunas de RV⁹⁸. En oposición a esto, en un estudio realizado con niños que recibieron Rotarix® en Zimbabue, en el que se observó un porcentaje muy bajo de respuesta a la vacuna, los análisis de la microbiota fecal mostraron que *B. thetaiotaomicron* fue la única bacteria que se correlacionó con altos títulos específicos de IgA (respondedores)¹³⁶.

V. INTRODUCCIÓN

Recordemos que Pither *et al.* observaron que el LPS de esta bacteria dio lugar a la activación del receptor TRL2⁸², a diferencia de los resultados obtenidos por d’Hennezel *et al.* con diferentes especies de *Bacteroides* (*B. ovatus*, *B. uniformis* y *B. vulgatus* como especies dominantes en la muestra utilizada)⁸⁰.

Otros estudios realizados con lactantes indios vacunados con Rotarix® no mostraron diferencias significativas en la composición de la microbiota entre respondedores y no respondedores. Sin embargo, en este estudio Rotarix® fue coadministrada junto a la vacuna oral contra la poliomielitis (OPV, por sus siglas en inglés), por lo que pudo afectar a la composición de la microbiota¹³⁷. En cuanto a la vacuna RotaTeq® (genotipos G1 a G4 y P[8])¹⁹, un estudio realizado con niños nicaragüenses tampoco encontró diferencias estadísticamente significativas en la composición del microbioma entre respondedores y no respondedores a la vacuna⁴⁴. Dado que el tamaño de muestra de estos estudios es pequeño, sería recomendable realizar más investigaciones para obtener resultados más fiables.

Otro estudio reciente evaluó si la modificación de la microbiota mediante el uso de antibióticos de amplio espectro (combinación de vancomicina, ciprofloxacino y metronidazol) y de bajo espectro (vancomicina) tenía un efecto en la inmunización con Rotarix® en adultos (Figura 9). Aunque los grupos experimentales no difirieron en términos de producción total de IgA, el grupo que recibió antibióticos de bajo espectro mostró un aumento en los niveles de IgA en el día 7 después de la vacunación (los niveles basales de IgA anti-RV eran altos en todos los grupos) y la excreción viral se incrementó en ambos grupos tratados con antibióticos. Se observaron diferencias en la composición de la microbiota en las heces entre los grupos y se establecieron correlaciones entre el aumento de la excreción viral y el enriquecimiento en poblaciones de *Bacteroides* spp. en el día 7 tras la vacunación. El tratamiento con antibióticos no tuvo efecto en la inmunogenicidad de otras vacunas sistémicas aplicadas (vacuna neumocócica y vacuna antitetánica)¹³⁸.

V. INTRODUCCIÓN

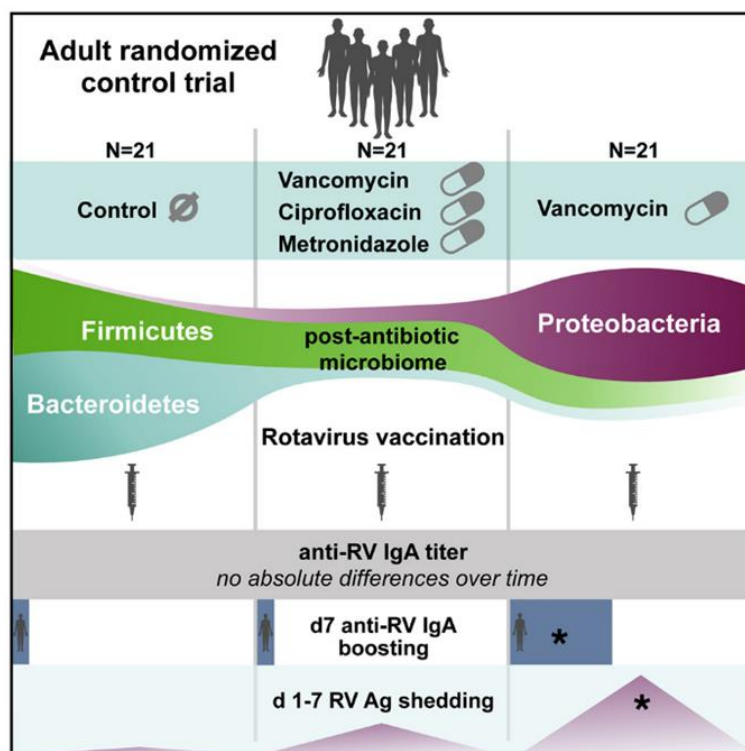


Figura 9. Efecto de la modulación de la microbiota en la eficacia de la vacuna Rotarix® en adultos. Este ensayo controlado aleatorizado en adultos evaluó el efecto de la modulación del microbioma mediante el uso de antibióticos de amplio espectro, antibióticos de bajo espectro o la ausencia de antibióticos en la efectividad de la vacuna. Los títulos absolutos de IgA anti-RV no mostraron cambios. Sin embargo, los antibióticos resultaron en un aumento en la potenciación a los 7 días y en una mayor eliminación de antígenos de RV. Extraído de Harris *et al.*, 2018¹³⁸.

Estos resultados resaltan el hecho de que dirigirse a la microbiota podría ser una estrategia alternativa para mejorar la eficacia de las vacunas de RV, aunque la efectividad en niños aún necesita más investigación.

Sin embargo, ninguno de los estudios mencionados anteriormente consideró la glicobiología en la eficacia de la vacuna. Otros estudios determinaron que las tasas de seroconversión de IgA anti-RV después de la vacunación con Rotarix® diferían significativamente dependiendo del fenotipo HBGA salival, siendo las tasas más bajas de seroconversión (no respondedores) en lactantes no secretores^{139–141}. Este hallazgo es consistente con datos *in vitro*, que demostraron que las cepas de genotipo P[8] interactúan con antígenos del tipo H y Le^b^{45,46,49}. Hay que tener en cuenta que estos dos antígenos son carbohidratos expresados solo en individuos con alelos funcionales de *fut2* (Figura 6). Por lo tanto, las diferencias en la expresión de HBGA pueden ser responsables de algunas de las discrepancias en el nivel de protección detectado para

V. INTRODUCCIÓN

las vacunas de RV en las distintas poblaciones de individuos pertenecientes a países de bajos y altos ingresos.

Otros estudios han aplicado la secuenciación del ADNr 16S para analizar la microbiota intestinal de grupos de voluntarios, examinando la susceptibilidad a RV y NoV, medida como el nivel de IgA salival específica de estos virus, y realizando el genotipado de *fut2*¹⁴². Los resultados mostraron que los tres factores (microbiota intestinal, genotipo de *fut2* y susceptibilidad a RV y NoV) están interconectados. También se encontró que ciertos géneros bacterianos, como *Ruminococcus* spp., se correlacionaban negativamente con la susceptibilidad a RV y NoV, mientras que *Akkermansia* spp. (un degradador de mucina intestinal) se correlacionaba positivamente con los títulos de IgA anti-RV.

Todos estos hallazgos pueden ayudar a mejorar el rendimiento de las vacunas de RV con el objetivo de aumentar la eficacia en los países de bajos ingresos, previniendo decenas de miles de muertes relacionadas con RV cada año. Sin embargo, existen diferencias en las conclusiones extraídas de los análisis de la microbiota, y se necesitan métodos estandarizados y controlados (por ejemplo, técnicas de muestreo y extracción de ADN, plataformas de secuenciación del ADNr 16S, métodos de análisis de la composición microbiana, etc.) para obtener una imagen más clara.

En el ámbito de la investigación clínica, la situación es distinta cuando se trata de NoV. Hasta el momento, la falta de una vacuna efectiva frente a este virus ha limitado la posibilidad de llevar a cabo estudios sobre la eficacia de la vacuna en relación con las variaciones en la composición de la microbiota. Aunque no hay vacuna comercialmente disponible frente a HuNoV, algunas se encuentran en ensayos clínicos⁹. El candidato más avanzado en el proceso de producción es la vacuna TAK-214 (Takeda Pharmaceuticals Company Limited, Osaka, Japón). Se trata de una vacuna bivalente basada en VLPs (genotipos GI.1/GII.4), de administración intramuscular, que actualmente se encuentra en fase III y ha mostrado una elevada inmunogenicidad en niños de 1 a 8 años¹⁴³. Aunque la vacuna no logró prevenir de manera significativa la gastroenteritis aguda, redujo la diarrea grave y los vómitos. Además, resultó bien tolerada e inmunogénica, y los anticuerpos generados mostraron actividad de bloqueo de la unión de las VLPs a los

V. INTRODUCCIÓN

HBGAs ensayados (H tipo 1 para GI.1 y H tipo 3 para GII.4). En cuanto al estado secretor, los individuos secretores y no secretores respondieron de manera similar a la primera dosis de la vacuna^{144,145}. Sin embargo, es poco probable que esta diferencia genética en el intestino delgado tenga un gran impacto en la inmunogenicidad de las vacunas basadas en VLPs, pues la mayoría están diseñadas para administración parenteral, por lo que su efecto a nivel de intestino no puede ser evaluado.

Algunos ensayos clínicos han estudiado la relación entre las bacterias probióticas y su influencia en las infecciones por virus entéricos. Si bien los ensayos *in vitro* y los estudios en modelos animales han ayudado a determinar cepas probióticas con actividad antiviral que pueden ser útiles en el tratamiento de las infecciones por RV, existe una gran controversia en cuanto a sus efectos beneficiosos en humanos. Pocos ensayos clínicos han estudiado la influencia de los probióticos en las infecciones por RV y se pueden encontrar muchas discrepancias. Algunos de ellos determinaron que el tratamiento con probióticos en pacientes con diarrea relacionada con RV produce una duración más corta de la diarrea, menos excreción de RV, una rápida mejora de la consistencia de las heces y menor número de deposiciones^{146–155}, mientras que solo dos de ellos encontraron una reducción en la frecuencia de vómitos^{150,156}. Uno de ellos incluso concluye que los probióticos reducen el riesgo de GEA por RV nosocomial¹⁵⁷. Por el contrario, casi la mitad de los ensayos clínicos analizados determinaron que la ingesta de probióticos no produce ninguna mejora en los síntomas de la diarrea relacionada con RV^{158–166}. De nuevo, el número de sujetos participantes en estos ensayos clínicos, el probiótico utilizado, los métodos de aplicación, las dosis y la forma en que se miden los efectos son factores que pueden afectar los resultados, por lo que, una vez más, se requieren condiciones de ensayo estandarizadas y controladas para evaluar la eficacia de los probióticos en la GEA viral.

VI. OBJETIVOS



VI. OBJETIVOS

Los estudios presentados anteriormente confirman la influencia que la microbiota posee sobre las infecciones virales entéricas, así como sobre otros virus no entéricos. Sin embargo, los mecanismos subyacentes no han sido estudiados en detalle en el caso de RV y NoV, y se necesitan nuevos estudios para obtener conocimientos al respecto. Además, se conocen pocos ejemplos sobre los mecanismos que permiten una mayor o menor infección de RV y NoV *in vivo* debido a la falta de un modelo de replicación de RV y NoV humanos en ratón.

Por tanto, el objetivo principal de este proyecto de tesis fue conocer las interacciones establecidas entre los virus y la microbiota y descifrar su efecto sobre la susceptibilidad viral. Para ello, los objetivos específicos propuestos fueron:

1. Desenmascarar los miembros de la microbiota que interaccionan físicamente con rotavirus y norovirus en muestras clínicas.
2. Evaluar la expresión en la superficie bacteriana de componentes similares a los antígenos del grupo histosanguíneo.
3. Determinar el efecto de la microbiota sobre la adhesión/infección *in vitro*.
4. Desarrollar un modelo de replicación de rotavirus y norovirus humanos en ratón con trasplante de microbiota humana.
5. Estudiar el efecto mediado por cambios en la microbiota en la infección de rotavirus y norovirus en el modelo murino.
6. Encontrar biomarcadores bacterianos que muestren una influencia en la restricción o favorecimiento de la infección por rotavirus y norovirus humanos en el modelo murino.
7. Conocer los cambios en la expresión génica de mediadores inmunológicos y de *Fut2* en respuesta a la replicación viral tras los tratamientos con diferentes tipos de microbiota en el modelo murino.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS



VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los experimentos realizados con ratones se llevaron a cabo en el Servicio de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Valencia, siguiendo las regulaciones nacionales e internacionales. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética para el Bienestar Animal y por la "Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca" de la "Generalitat Valenciana", con el número de expediente 2018/VSC/PEA/0181 aprobado el 19 de diciembre de 2018.

Las muestras de heces humanas pudieron ser analizadas tras recibir el consentimiento informado de los padres o tutores legales de los pacientes y su utilización fue aprobada por el Comité de Ética en Investigación con Humanos de la Universidad de Valencia (número de registro H154401046838). Todas las gráficas mostradas en este trabajo fueron elaboradas utilizando la herramienta GraphPad Prism v8.4.3.

1. Detección y tipificación de rotavirus y norovirus a partir de muestras clínicas

1.1. Recolección de muestras

Los experimentos de esta tesis pudieron ser realizados a partir de la recolección de muestras de heces de pacientes menores de 5 años diagnosticados de gastroenteritis aguda por rotavirus (año 2015) y norovirus (entre 2015 y 2019) en el servicio de Microbiología Clínica del Hospital Clínico de Valencia. Las heces fueron mantenidas a -80°C hasta su uso. Las muestras de RV fueron diagnosticadas cualitativamente como positivas mediante test rápido de inmunocromatografía (CerTest Biotec, Zaragoza, España) en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico de Valencia. Hasta el año 2018, la presencia de NoV en muestras de heces era confirmada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina (Universitat de València) mediante detección por RT-PCR convencional. A partir de 2018, el Hospital Clínico de Valencia incorporó el sistema BD Max® (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, EE. UU.) para detección de patógenos entéricos, tanto bacterias (BD MAX Enteric Bacterial Panel Nº catálogo 442963), como virus (BD MAX Enteric Viral Panel Nº catálogo 443985), con el que se puede realizar de manera automatizada la detección, entre otros, de RV y NoV por RT-PCR en tiempo real.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

La selección de las muestras clínicas utilizadas para el desarrollo de los experimentos se realizó en base a su elevada carga viral y su caracterización genotípica (apartado 1.3 de Material y Métodos). Atendiendo a esto, las muestras seleccionadas fueron el genotipo G1P[8] de RVA y la variante GII.4 Sydney 2012 de NoV GII, asociada a distintos genotipos de polimerasa viral ([P4], [P4 New Orleans 2009] y [P16]).

1.2. Extracción de ARN y transcripción reversa

El estudio de caracterización de las cepas de RV (genotipos de VP7 y de VP4) y de NoV GII (genotipo de RdRP y de VP1) fue realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina (Universitat de València).

El método escogido para llevar a cabo el aislamiento y purificación de ARN vírico a partir de las muestras de heces fue el de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo usando el reactivo comercial TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.)¹⁶⁷. Para ello, las muestras de heces fueron resuspendidas previamente al 10 % (p/v) en tampón fosfato salino al 1 X (PBS, de PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Alemania). Para la obtención del ADN complementario (ADNc), se añadieron 10 µl del ARN en un tubo para PCR de 0,2 µl. Se realizó una desnaturalización inicial a 97°C (RV) o 65°C (NoV) durante 5 min. Por último, se preparó la mezcla de reacción para un volumen final de 30 µl. En la Tabla 1 se indican los reactivos utilizados, sus concentraciones iniciales y el volumen final. La transcripción reversa fue realizada mediante un ciclo de 50 min a 50°C seguido de un ciclo de 15 min a 70°C.

Tabla 1. Mezcla de reacción para la transcripción reversa de ARN viral.

Reactivo y casa comercial	Concentración inicial	Volumen final (µl/muestra)
Tampón de reacción con MgCl ₂ (Invitrogen)	5X	6
dNTPs (Biotools)	10 mM	1
DTT (Invitrogen)	0,1 M	1,5
Random primers (Biotools)	50 µM	0,5
RNase Inhibitor (Biotools)	40 U/µl	0,25
SuperScript® III (Invitrogen)	200 U/µl	0,2
Agua DEPC Ultrapura (Invitrogen)		10,55
ARN desnaturalizado		10
Volumen total (µl/muestra)		30

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

1.3. Caracterización genotípica de las muestras clínicas

A continuación, se describen las condiciones para la amplificación del ADNc correspondiente a los genes que nos permiten caracterizar genotípicamente a RV (VP7 o genotipo G y VP4 o genotipo P) y a NoV (*RdRP* o genotipo P y VP1 o genotipo G).

1.3.1. Rotavirus

La caracterización de RV se realizó mediante métodos estandarizados siguiendo las directrices establecidas por la Red Europea EuroRotaNet¹⁶⁸. El ADNc fue amplificado utilizando pares de cebadores consenso VP7-F/VP7-R (VP7-F, 5'-ATGTATGGTATTGAATATACCAC-3', nt 51-71; VP7-R, 5'-AACTTGCCACCATTTTTTCC-3', nt 914-932)¹⁶⁹ y VP4-F/VP4-R (VP4-F, 5'-TATGCTCCAGTNAATTGG-3', nt 132-149; VP4-R, 5'-ATTGCATTCTTTCCATAATG-3', nt 775-795)¹⁷⁰ como punto de partida para la amplificación de un fragmento de los genes VP7 y VP4, respectivamente.

En la Tabla 2 se indican los reactivos utilizados, sus concentraciones iniciales y el volumen final de la amplificación de VP7 y VP4. El protocolo térmico empleado fue de 1 ciclo de 2 min a 94°C seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 52°C (VP7) o 50°C (VP4) y 1 min a 72°C. Por último, una extensión final de 7 min a 72°C.

Tabla 2. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de los genes VP7 y VP4 de rotavirus.

Reactivo y casa comercial	Concentración inicial	Volumen final (μl/muestra)
Tampón de reacción con 2 mM de MgCl ₂ (Biotools)	10X	5
dNTPs (Biotools)	10 mM	1
Cebador VP7-F o VP4-F (Sigma Genosys)	10 μM	2
Cebador VP7-R o VP4-R (Sigma Genosys)	10 μM	2
Taq ADN polimerasa (Biotools)	5 U/μl	0,4
Agua Milli-Q®		34,6
ADNc		5
Volumen total (μl/muestra)		50

Tras la primera amplificación, el genotipado se realizó mediante una PCR múltiple semi-anidada utilizando cebadores específicos que identifican los tipos G y P más relevantes (Tabla 3)¹⁷⁰⁻¹⁷⁴. En el tipado de VP7 y VP4 se reutilizan los cebadores VP7-R y VP4-F, respectivamente.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 3. Información de las secuencias de los cebadores usados para el tipado de VP7 (G) y VP4 (P) de rotavirus.

Cebador	Secuencia 5' → 3'	Posición nucleótidos
G1	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	314–335
G2	CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G	411–435
G3	ACG AAC TCA ACA CGA GAG G	250–269
G4	CGT TTC TGG TGA GGA GTT G	480–499
G8	GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG	178–198
G9	CTT GAT GTG ACT AYA AAT AC	757–776
G10	ATG TCA GAC TAC ARA TAC TGG	666–687
G12	GGT TAT GTA ATC CGA TGG ACG	548–567
P[4]	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	474–494
P[6]	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	259–278
P[8]	TCT ACT GGR TTR CAN TGC	339–356
P[9]	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	385–402
P[10]	ATC ATA GTT AGT AGT CGG	575–594
P[11]	GTA AAC ATC CAG AAT GTG	305–323

En la Tabla 4 se muestran las condiciones de PCR para el genotipado de VP7 y de VP4. El protocolo térmico para la caracterización genotípica fue de 1 ciclo de 2 min a 94°C seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 42°C (VP7) o 45°C (VP4) y 1 min a 72°C. Por último, una extensión final de 7 min a 72°C.

Tabla 4. Mezcla de reacción para la PCR de tipado de VP7 y VP4 de rotavirus.

Reactivo y casa comercial	Concentración inicial	Volumen final (μl/muestra)
Tampón de reacción con 2 mM de MgCl ₂ (Biotools))	10X	5
dNTPs (Biotools)	10 mM	0,5
Cebador VP7-R o VP4-F (Sigma Genosys)	10 μM	1
Cebadores G o P (Sigma Genosys)	10 μM	1
Taq ADN polimerasa (Biotools)	5 U/μl	0,4
Agua Milli-Q®		34,1 (VP7) o 35,1 (VP4)
Producto primera PCR		1 (VP7) o 2 (VP4)
Volumen total (μl/muestra)		50

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

1.3.2. Norovirus

Para llevar a cabo el genotipado de NoV GII, tras la transcripción reversa, el ADNc fue amplificado mediante dos PCRs independientes para determinar el genotipo P (RdRP, en ORF1) y G (VP1, en ORF2) mediante el par de cebadores JV12/JV13 (JV12, 5'-ATACCACTATGATGCAGATTA-3', nt 4552-4572; JV13, 5'-TCATCATCACCATAGAAAGAG-3', nt 4878-4858)¹⁷⁵ y G2SK-F/G2SK-R (G2SK-F 5'-CNTGGGAGGGCGATCGCAA-3', nt 5058-5076; G2SKR 5'-CCRCCNGCATRHCCRTTTRTACAT-3', nt 5379-5401)¹⁷⁶, respectivamente.

En la Tabla 5 se resumen las condiciones de PCR para la amplificación de los genes de la RdRP y de la proteína VP1. El protocolo de ciclos de temperatura llevado a cabo fue de 1 ciclo de 2 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C y 30 s a 72°C; con una extensión final de 1 ciclo 10 min a 72°C.

Tabla 5. Mezcla de reacción para la PCR de amplificación de los genes *RdRP* y *VP1* de norovirus GII.

Reactivo y casa comercial	Concentración inicial	Volumen final (μl/muestra)
Tampón de reacción con 2 mM de MgCl ₂ (Biotools)	10X	5
dNTPs (Biotools)	10 mM	0,5
Cebador JV12 o G2SK-F (Sigma Genosys)	10 μM	3
Cebador JV13 o G2SK-R (Sigma Genosys)	10 μM	3
Taq ADN polimerasa (Biotools)	5 U/μl	0,5
Agua Milli-Q®		33
ADNc		5
Volumen total (μl/muestra)		50

1.4. Secuenciación Sanger

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en tampón Tris-borato-EDTA (0,5 X TBE), tinción con 1 X RedSafe (iNtRON Biotechnology, Corea del Sur) y observación en el sistema de imagen molecular automatizado Amersham™ Imager 680 (Cytiva, Massachusetts, EE. UU.).

Posteriormente fueron secuenciados mediante el método de Sanger en un secuenciador de 96 capilares ABI3730xl (Applied Biosystems de Thermo Fisher Scientific) en el Servicio de Genómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF).

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron como iniciadores de la secuenciación los pares de cebadores descritos anteriormente (VP7-F/VP7-R y VP4-F/VP4-R para RVA; JV12/JV13 y G2SK-F/G2SK-R para NoV GII). Los resultados de la secuenciación se compararon con las bases de datos online de tipificación de genotipos de RVA y NoV^{177,178}.

2. Obtención de partículas virales de rotavirus G1P[8], norovirus GII.4 Sydney 2012 [P16] y VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012

2.1. Partículas de rotavirus G1P[8]

La cepa de RVA utilizada en los distintos experimentos fue Wa, una cepa humana adaptada a cultivo y de genotipo G1P[8]. Para su propagación y cuantificación se siguió el protocolo publicado por Arnold M *et al.* (basic protocol 1), con distintas modificaciones¹⁷⁹. El virus se cultivó en células epiteliales de riñón de mono (MA-104) crecidas en medio mínimo esencial (MEM, Gibco™ de Thermo Fisher Scientific) suplementado con 1 % penicilina y estreptomicina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de glutamina y 10 % de suero bovino fetal. La infección con la cepa Wa (previamente activada durante 1 h a 37°C con 10 µg/ml de tripsina IX) se realizó sobre una monocapa confluyente de células crecidas en frascos de 150 cm² (aproximadamente a 1,5x10⁷ células/frasco) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1. El volumen final de células infectadas fue de 300 ml (10 frascos a 30 ml/frasco). Los frascos con células infectadas se mantuvieron a 37°C durante una semana. Después de la infección, el virus fue recuperado del sobrenadante y del interior de las células tras aplicar dos ciclos de congelación-descongelación.

Con el objetivo de obtener una reserva de virus, se procedió a su purificación y concentración mediante ultracentrifugación. En primer lugar, se centrifugó la suspensión de virus (300 ml) en el rotor TS-5.1-500 (centrífuga TJ-25 de Beckman Coulter Inc, Brea, California, EE. UU.) a 7500 x g durante 15 min a 4°C para eliminar restos celulares. A continuación, el sobrenadante (con virus) fue precipitado a 100.000 x g durante 2 h a 4°C en el rotor Himac R25ST-0507 en la centrífuga Himac CR-30N (Eppendorf Himac Technologies Co., Tokio, Japón). El pellet fue resuspendido a 4°C con 6 ml de medio MEM sin suero durante la noche (ON, por sus siglas en inglés). Posteriormente, se procedió con la purificación a través de un gradiente de sacarosa (30 % - 70 %) en tampón TNC (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂) mediante ultracentrifugación a 150.000

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

x g durante 4 h a 4°C (rotor SW41 en la ultracentrífuga L8-M de Beckman Coulter Inc). Se recuperó la fracción contenida entre el 70 % y el 30 % correspondiente al virus (aproximadamente 2 ml) y se centrifugó de nuevo a 150.000 x g durante 4 h a 4°C. El precipitado fue rehidratado ON a 4°C con 1 ml de TNC.

Después de la purificación, las partículas de RV Wa fueron cuantificadas de dos formas: ensayo de focos fluorescentes (según el protocolo alternativo 4 de Arnold M *et al.*)¹⁷⁹ y RT-qPCR (apartado 6.1 de Material y Métodos)¹⁸⁰.

2.2. Partículas de norovirus GII.4 Sydney 2012

Se realizó un cribado de aquellas muestras de heces con NoV que habían sido caracterizadas como GII.4 Sydney 2012, con banda intensa por PCR convencional y/o cuantificadas con elevada carga viral por el sistema BD Max®, tal y como se ha descrito en el apartado 1 de Material y Métodos. El principal motivo de esta búsqueda fue seleccionar una cepa con la que realizar el experimento de infección en ratones. No obstante, algunas de las cepas también se utilizaron para evaluar la especificidad del anticuerpo anti-VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 (apartado de 3.2 de Material y Métodos) frente a cepas GII.4 Sydney 2012 con el objetivo de aplicarlo en las distintas técnicas inmunológicas realizadas en esta tesis.

Tras el cribado, se seleccionaron un total de 22 muestras que reunieron los criterios establecidos. Se mezcló 1 g de heces con 9 ml de PBS 1 X y se homogenizó vigorosamente durante 5 min con agitador vórtex. Se centrifugó a 15.000 x g en el rotor 5424R (centrífuga 5424R de Eppendorf AD, Hamburgo, Alemania) durante 20 min a 4°C para eliminar bacterias y restos celulares. El sobrenadante clarificado fue ultracentrifugado a 150.000 x g durante 2 h a 4°C con en el rotor SW41 en la ultracentrífuga L8-M de Beckman Coulter Inc. El virus precipitado fue resuspendido en 10 ml de PBS 1 X estéril y almacenado en alícuotas a - 20°C hasta su uso.

La concentración final fue determinada mediante RT-PCR en tiempo real en el termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) tal y como se detalla en el apartado 6 de Material y Métodos^{181,182}.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

2.3. VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012

2.3.1. Expresión de VLPs en células de insecto *Sf9*

La expresión de VLPs se llevó a cabo en células de insecto *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*) en suspensión, siguiendo las recomendaciones del manual Bac-to-Bac® Baculovirus Expression Systems de Invitrogen (Cat. Nº 10359-016; 10608-016)¹⁸³, con algunas modificaciones. En la Figura 10 se muestra un esquema del procedimiento.

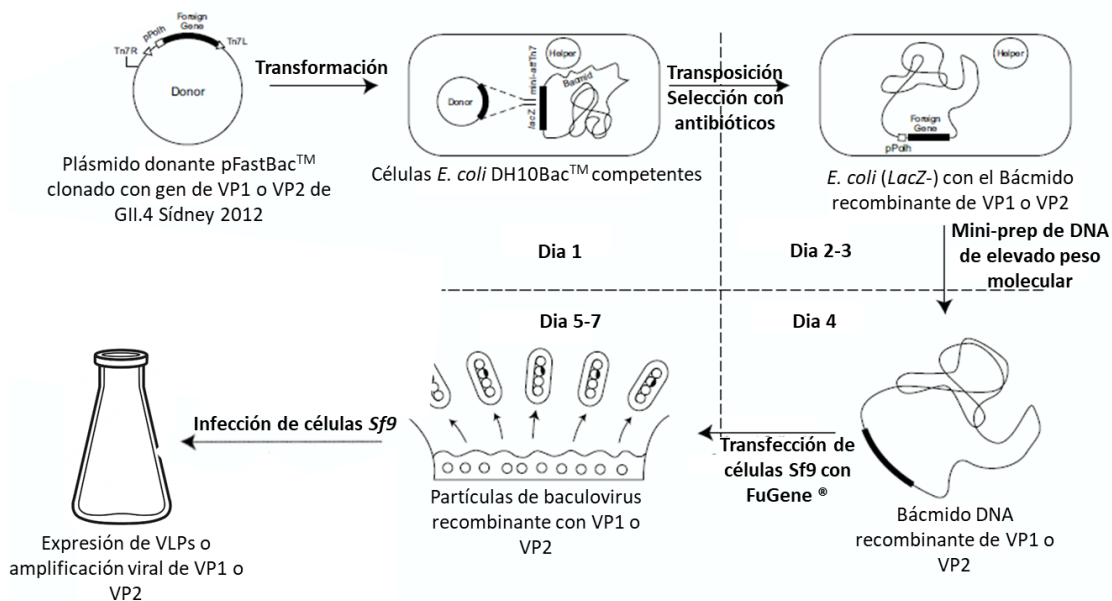


Figura 10. Esquema del protocolo de expresión de VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012 en células de insecto *Sf9*. Imagen modificada del manual Baculovirus Expression Systems de Invitrogen (Cat. Nº 10359-016; 10608-016)¹⁸³.

En primer lugar, se solicitaron los genes sintéticos (optimizados para expresión en células de insecto utilizando la tecnología GeneArt de Thermo Fisher Scientific) seleccionados a partir de las secuencias codificantes para VP1 (ORF2) y VP2 (ORF3) extraídas de una cepa clínica (número de acceso MN248513.1, Genbank). Cada uno de los genes fueron clonados en el vector pFastBac 1 (Thermo Fisher Scientific) y con los plásmidos se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH10Bac. Tras la transfección durante 72 h de las células *Sf9* con los respectivos bácmidos, el stock viral de VP1 y VP2 se amplificó infectando una suspensión de 30 ml de células *Sf9* (3×10^6 células/ml) a una MOI de 0,1 para obtener mayor volumen y concentración de virus con el que poder infectar posteriormente. Las células se mantuvieron en medio SF900 SFMII (Thermo Fisher Scientific) suplementado con antibióticos y 1 % de Pluronic (Sigma-

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Aldrich, St. Louis, MO) en frascos de cultivo con aireación a 120 rpm y 27°C. La amplificación de cada uno de los baculovirus se mantuvo durante 5 días. Finalmente, un volumen de 500 ml de una suspensión de células a 3×10^6 células/ml fue inoculado con una mezcla de los baculovirus VP1 y VP2 en igual proporción, quedando a una MOI final de 1. La producción de las VLPs se mantuvo durante 5 días.

2.3.2. Purificación de las VLPs

La suspensión de 500 ml se centrifugó a 1000 x g durante 10 min a 4°C en el rotor R7A-4007 en la centrífuga Himac CR-30N (Eppendorf Himac Technologies Co.) para eliminar los restos celulares. A continuación, el sobrenadante con las VLPs y los baculovirus se centrifugó a 100.000 x g durante 1 h a 4°C en el rotor Himac R25ST-0507 para sedimentar los virus. El sobrenadante con las VLPs se mantuvo en agitación durante la noche a 4°C con 15 % de PEG 8000 y 0,3 M de NaCl para aglutinar las partículas y luego se centrifugó a 10.000 x g durante 30 min a 4°C en el rotor Himac R16A2 para precipitarlas. El precipitado resultante fue resuspendido en 22 ml de PBS 1 X filtrado (0,22 μ m) y se le añadió 1 % de Tritón™ X-100, 3,6 U de DNasa I y 1 mM de inhibidor de proteasas PMSF (todos de Sigma-Aldrich). Esta mezcla se mantuvo durante 30 min en agitación suave a temperatura ambiente y luego fue ultracentrifugada a 197.000 x g durante 12 h a 4°C en el rotor SW41 en la ultracentrífuga L8-M (Beckman Coulter Inc.). El sedimento se rehidrató con 2 ml de PBS 1 X durante la noche a 4°C. Por último, tras resuspenderlo suavemente, se centrifugó durante 5 min a 15.000 x g en microcentrífuga Eppendorf. Las VLPs solubles en el sobrenadante se mantuvieron a 4°C hasta su uso. La calidad de la purificación fue analizada mediante electroforesis en gel al 12 % de SDS-PAGE, con tinción con azul de Coomassie y cuantificación a una absorbancia de 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™ de Thermo Fisher Scientific). En la Figura 2 se muestra el aspecto de las VLPs (cantidades crecientes) en el gel de electroforesis tras ser teñido. Las bandas presentan un peso molecular de 55 - 60 KDa.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

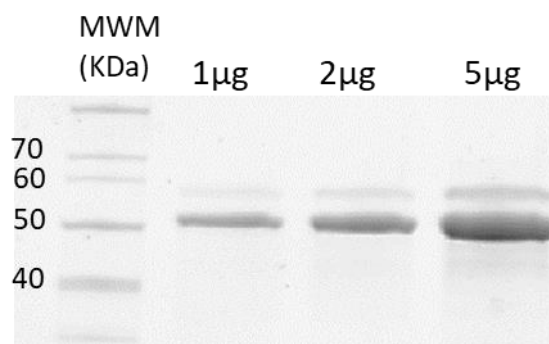


Figura 11. Visualización de la expresión y purificación de las VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012. Se muestra un SDS-PAGE al 12 % con tinción con azul de Coomassie. El primer carril corresponde al patrón de pesos moleculares (MWM) y los tres carriles siguientes a cantidades crecientes de VLPs (1 µg, 2 µg y 5 µg) medidas a una absorbancia de 280 nm mediante NanoDrop™ 2000.

3. Obtención y purificación de anticuerpos policlonales

Los anticuerpos utilizados en los distintos experimentos de esta tesis fueron obtenidos del suero de ratones hembra C57BL/6J adquiridos de los laboratorios Charles River (Saint Germain Nuelles, Francia).

La muestra de sangre se tomó de la vena safena lateral y los anticuerpos fueron purificados del suero. Se obtuvieron dos grupos de anticuerpos IgG: anticuerpo para control de isotipo IgG del suero de ratones sin inmunizar y anticuerpo IgG anti-VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 tras la tercera inmunización con las VLPs obtenidas previamente. La inmunización con las VLPs se realizó cada 15 días mediante punción subcutánea con 100 µl de una mezcla compuesta por 10 µg de VLPs diluidas en 100 µl de PBS 1 X y 100 µl del adyuvante Alhydrogel® 2 % (InvivoGen, San Diego, California, EE. UU.).

Ambos anticuerpos fueron purificados a través de columna HiTrap Protein G HP mediante el sistema de cromatografía ÄKTA start (Cytiva) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Estas columnas permiten la separación rápida y sencilla de IgGs de diferentes especies y subclases. En resumen, 200 µl de cada suero se centrifugaron durante 15 min a 10.000 x g y a 4°C en microcentrífuga Eppendorf y el sobrenadante se mezcló con 800 µl de tampón de unión (1,5 M glicina, 3 M NaCl a pH 9,0). Tras equilibrar todo el sistema con este tampón, se inyectó el suero y se pasó por columna a un flujo de 1 ml/min. Los anticuerpos unidos a la columna fueron recuperados con tampón de elución (0,1 M glicina-HCl pH 2,7) y recogidos en fracciones de 1 ml en tubos conteniendo 100 µl de Tris 1 M a pH 8,0 para neutralizar la acidez del tampón de elución.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Comprobación de la pureza de los anticuerpos

Las fracciones donde se visualizaron picos de absorbancia (correspondientes a la detección de proteína) fueron evaluadas mediante electroforesis en gel SDS-PAGE seguida de tinción con azul de Coomassie con el objetivo de reunir aquellas que contuvieran los anticuerpos. Por un lado, se analizaron en un gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones no reductoras para visualizar una única banda de 150 KDa, correspondiente al anticuerpo completo (dos cadenas ligeras de 25 KDa más dos cadenas pesadas de 50 KDa). Por otro lado, se sometieron a condiciones reductoras mediante la electroforesis de un gel al 15 % para observar por separado la cadena ligera y la cadena pesada. La Figura 12 representa una muestra de la pureza de los anticuerpos IgG.

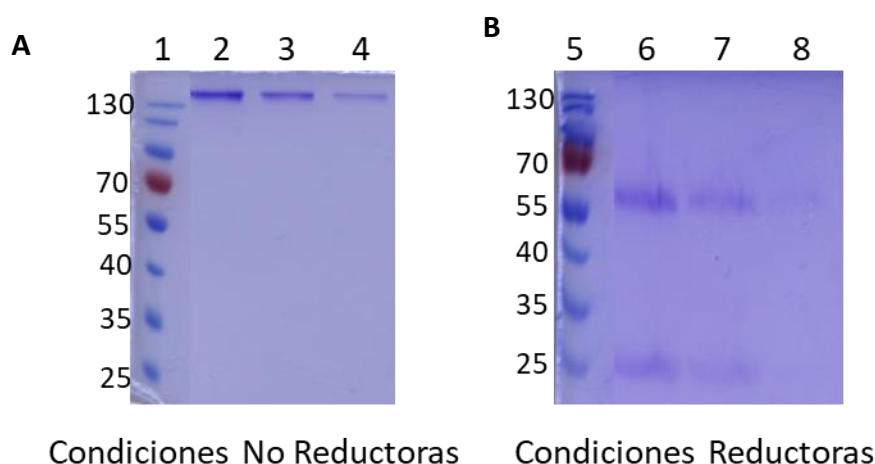


Figura 12. Visualización de la pureza de los anticuerpos IgG. Tinción con azul de Coomassie de los geles SDS-PAGE donde se corrieron las fracciones con los picos de absorbancia detectados en el sistema de cromatografía ÄKTA start. **A)** 10 % SDS-PAGE en condiciones no reductoras. se observa una banda de 150 KDa correspondiente al anticuerpo completo. **B)** 15 % SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se observa una banda de 50 KDa (cadena pesada) y otra de 25 KDa (cadena ligera). La banda más intensa del marcador de pesos moleculares equivale a un peso de 70 KDa. 1 y 5: Marcador de pesos moleculares; 2 a 4: bandas correspondientes a las tres fracciones con el anticuerpo corrido en condiciones no reductoras; 6 a 8: bandas correspondientes a las tres fracciones con el anticuerpo corrido en condiciones reductoras.

Por último, tras revisar el resultado, se mezclaron las fracciones correspondientes (con anticuerpo) y se llevó a cabo su concentración mediante centrifugaciones de 10 min a 5.000 x g en el rotor TS.5.1-500 utilizando tubos Amicon Ultra-4 con filtro de celulosa de 30 K (Merck Millipore, Massachusetts, EE. UU.). En el proceso de concentración, se realizó el cambio de tampón a PBS 1 X. La concentración final de cada uno de los anticuerpos se midió mediante el método de Bradford (absorbancia a 595 nm) obteniendo un resultado de 0,7 mg/ml para el control de isotipo de IgG y 1,9 mg/ml para el anticuerpo IgG anti-VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos

La especificidad del anticuerpo IgG anti-VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 fue evaluada mediante la técnica de Western blot frente a cepas de NoV GII.4 Sydney 2012 (apartado 2.2 de Material y Métodos). Las VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 con las que se inmunizaron los ratones se utilizaron como control positivo. En la Figura 13 se observa el reconocimiento del anticuerpo IgG anti-VLPs de NoV en muestras de heces con el virus.

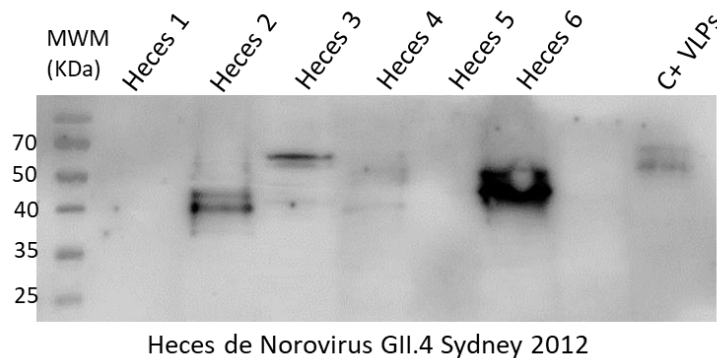


Figura 13. Evaluación de la especificidad del anticuerpo anti-VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012. Western blot de un gel al 12 % SDS-PAGE donde se analizaron diferentes muestras de heces (20 µl del purificado) con NoV GII.4 Sydney 2012. MWM (KDa): marcador de pesos moleculares.

4. Identificación de los componentes de la microbiota que interaccionan físicamente con rotavirus y norovirus

4.1. Aislamiento de microbiota a partir de heces humanas

A continuación, se detalla el procedimiento de separación de bacterias que interaccionan con cada uno de los virus en estudio. La primera parte de aislamiento de bacterias a partir de las heces fue común para los dos experimentos. Sin embargo, a partir del marcaje con anticuerpos, la técnica de separación de bacterias adheridas/no adheridas fue distinta para cada virus. En el caso de RV, la separación de bacterias se realizó por citometría de flujo mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) mientras que para NoV se emplearon partículas magnéticas.

Tal y como se ha comentado anteriormente, se seleccionaron las muestras de heces en función a su elevada carga viral (banda intensa en la amplificación por RT-PCR

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

convencional y/o bajo valor Ct en RT-qPCR) y caracterización genotípica. Finalmente, se seleccionaron 5 muestras de heces genotipadas como G1P[8] de RVA y 9 muestras de heces con NoV GII.4 Sydney 2012. Para detectar las bacterias que unen virus se siguió una estrategia similar a la empleada en cuantificar la unión *in vitro* de VLPs de NoV a las bacterias comensales del intestino mediante citometría de flujo¹⁸⁴. Se pesaron 200 mg de cada una de las heces seleccionadas y se resuspendieron en 1 ml de suero salino (SS, NaCl al 0,9 %), previamente filtrado con filtro de 0,22 µm. Posteriormente fueron agitadas a bajas revoluciones por minuto en vórtex durante 10 s. Posteriormente, se centrifugó a 2000 x g durante 2 min para eliminar restos celulares. Las bacterias contenidas en el sobrenadante fueron precipitadas a 12.000 x g durante 5 min y sometidas a dos lavados con 1 ml de SS. Tras el segundo lavado, el sedimento bacteriano fue resuspendido en 300 µl de SS y fijado durante la noche a 4°C con 1200 µl de paraformaldehído (PFA) al 4 %. De nuevo, se realizaron 3 lavados de 5 min a 12.000 x g con SS y finalmente las bacterias se resuspendieron en 1 ml de SS.

4.1.1. Aislamiento de bacterias a partir de las heces mediante citometría de flujo (rotavirus)

La alícuota de 1 ml de bacterias fijadas fue incubada con 1,5 µl de yoduro de propidio a 1 mg/ml (Thermo Fisher Scientific) durante 30 min a 37°C para marcar el ADN. Se reservaron 100 µl para estudiar la autofluorescencia y los 900 µl restantes se procesaron para la inmunotinción de RV. Las células se precipitaron y se resuspendieron en 150 µl de SS que contenía un 5 % de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) (Sigma-Aldrich) durante 1 h a 37°C para prevenir la unión inespecífica de anticuerpos. Luego, se agregaron 1,5 µl de anticuerpo policlonal IgG anti-RV (ab31435) conjugado a FITC (Abcam, Cambridge, Reino Unido) y se incubaron durante 1 h a 37°C. Por último, las células se centrifugaron a 12.000 x g durante 5 min, se lavaron dos veces y se resuspendieron en 1 ml de SS.

Por último, la separación de las células adheridas/no adheridas se realizó en la Sección de Cultivos Celulares y Citometría de la Unidad Central de Investigación de Medicina (UCIM, Valencia, España). En primer lugar, se midió la población bacteriana separada antes del marcaje con anticuerpo (medida de autofluorescencia) como punto de control. Posteriormente, las células bacterianas se separaron utilizando un citómetro

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

FACSria™III Cell y el software de análisis BD FACSDiva v6.1.6 (BD Biosciences, California, EE. UU.) equipado con un sistema de dos láseres a 488 nm y 633 nm (Figura 14). La separación de células se realizó con una boquilla de 70 μm . Los microorganismos se determinaron mediante un filtro en base a la dispersión de la luz frontal (FSC, por sus siglas en inglés) y en base a la dispersión lateral (SSC, por sus siglas en inglés). Se utilizó un detector del fluoróforo FITC (con filtro de paso de banda de 530/30 nm) para determinar los niveles de bacterias marcadas (unidas al RV) y se utilizó un detector PE para el yoduro de propidio (con filtro de paso de banda de 585/42 nm) para verificar la presencia de ADN. Los ajustes de los parámetros utilizados incluyeron una señal SSC de 200 unidades como umbral para definir un evento a contar, y voltajes de FSC, SSC, FITC y PE de 16, 308, 350 y 455, respectivamente. La Figura 14 muestra un esquema de citometría de flujo con la determinación de las distintas poblaciones bacterianas.

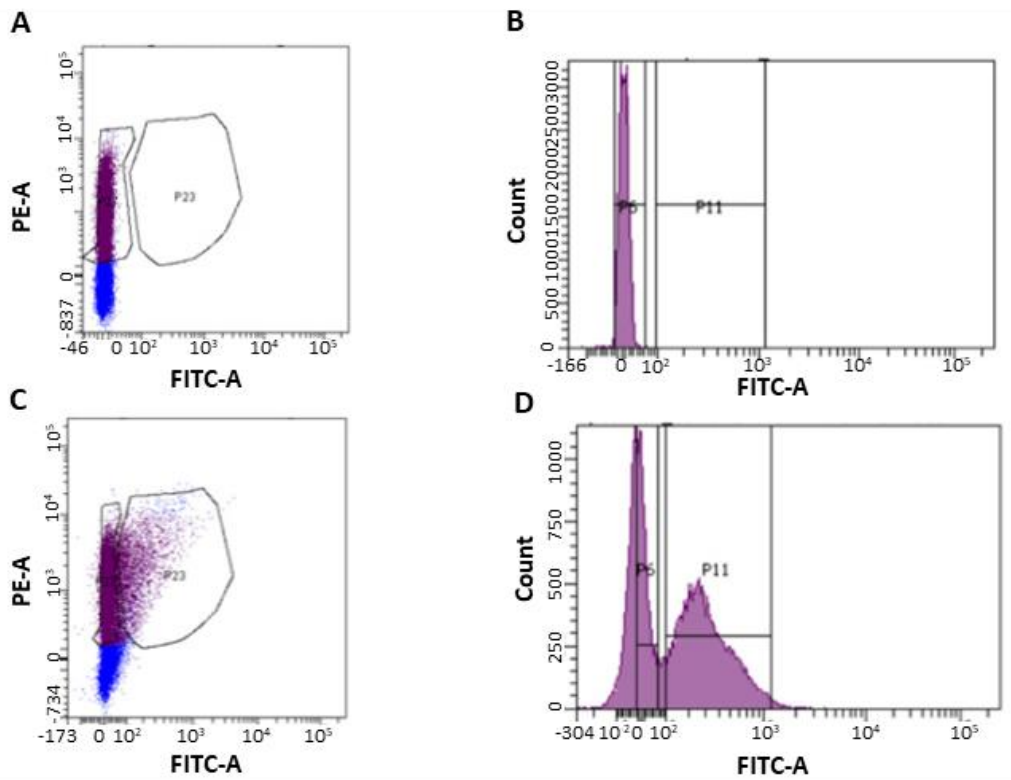


Figura 14. Clasificación de células por fluorescencia de la microbiota fecal unida a rotavirus G1P[8]. A) y B) Bacterias sin etiquetar de las heces de pacientes fueron sometidas a FACS para determinar la autofluorescencia y establecer la población no unida. **C) y D)** Las mismas bacterias fueron etiquetadas con FITC-anti-rotavirus y sometidas a FACS. La población P6 contenía las bacterias no fluorescentes, mientras que la población P11 contenía las bacterias fluorescentes con el rotavirus unido. Las bacterias (etiquetadas y no etiquetadas) se recolectaron por separado y se analizaron mediante secuenciación del ADNr 16S.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Finalmente, se obtuvieron dos poblaciones diferentes (fluorescentes, con RV; y no fluorescentes, sin RV) de cada una de las 5 muestras aisladas para llevar a cabo su análisis metagenómico. Posteriormente, se utilizaron los datos resultantes del análisis metagenómico para la elaboración de la gráfica mediante la herramienta GraphPad Prism v8.4.3.

4.1.2. Aislamiento de bacterias a partir de las heces mediante partículas magnéticas (norovirus).

En este caso, para llevar a cabo el estudio metagenómico, se aislaron 4 poblaciones bacterianas de cada una de las 9 muestras de heces seleccionadas: bacterias totales aisladas antes de los tratamientos (T), bacterias reconocidas por el anticuerpo control de isotipo IgG (C), bacterias no reconocidas por el anticuerpo control de isotipo IgG ni por el anticuerpo específico (N) y bacterias reconocidas por el anticuerpo anti-VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 (NoV). Para la separación se empleó la técnica de inmunoprecipitación con partículas magnéticas mediante el kit comercial de Pierce® MS-compatible Magnetics IP Kit – Protein A/G (Thermo Fisher Scientific).

De la alícuota de 1 ml de bacterias fijadas, 200 µl fueron apartados como representación de las bacterias totales (T). Los 800 µl restantes fueron centrifugados a 12.000 x g durante 5 min y el precipitado fue resuspendido con 150 µl de SS con solución de bloqueo (BSA al 5 % y 2 µg de anticuerpo de control de isotipo IgG). Esta mezcla fue incubada durante 1 h a 37°C y mantenida durante la noche a 4°C. Posteriormente, se añadieron 25 µl de partículas y se mantuvo durante 1 h a temperatura ambiente en rotación con el agitador Intelli-Mixer™ RM-2L (ELMI, California, EE. UU.) a 95 rpm con el programa C1. Seguidamente, las partículas magnéticas fueron desplazadas hacia el imán DynaMag™-2 (Thermo Fisher Scientific) y se resuspendieron en 100 µl de SS. Las bacterias separadas en este paso fueron las reconocidas por el anticuerpo control de isotipo IgG (C). A continuación, el sobrenadante fue incubado durante 1 h a 37°C en rotación con 2 µg de anticuerpo anti-VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012. Tras este tiempo, se separaron las bacterias unidas a las partículas magnéticas (bacterias con NoV unido, NoV) y se resuspendieron en 100 µl de SS. El sobrenadante restante fue centrifugado a 12.000 x g durante 5 min y el precipitado (bacterias no reconocidas por el anticuerpo

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

control de isotipo IgG ni por el anticuerpo específico, N) fue resuspendido en 100 µl de SS.

4.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Tras visualizar los resultados del análisis del ADNr 16S (apartados 7 y 8 de Material y Métodos), se procedió a solicitar distintas cepas de los géneros bacterianos que más unieron a RV (*Ruminococcus* spp.) y a NoV (*Rhodococcus* spp.).

Para el estudio de interacción con RV se utilizaron las cepas *R. gauvreauii* DSM-19829 y *R. gauvreauii* IPLA-NM1. La cepa *R. gauvreauii* DSM-19829 se adquirió de la Colección DSMZ (Leibniz Institute, Alemania) y la cepa IPLA-NM1 se aisló de una muestra de bilis humana¹⁸⁵. Dada su naturaleza de carácter anaeróbico, se cultivaron en medio anaerobio de Gifu (GAMc; Nissui Pharmaceutical, Japan) suplementado con 0,25 % (p/v) de L-cisteína (Sigma-Aldrich) e incubados a 37°C durante 72 h en una cámara anaeróbica Whitley MG500 (Don Whitley Scientific, Bradford, Reino Unido) bajo una atmósfera de gas (10 % H₂, 10 % CO₂ y 80 % N₂). Las dos cepas se mantuvieron creciendo rutinariamente en placas de agar GAMc al 2 % en condiciones anaeróbicas.

En el caso de NoV, se seleccionaron 5 cepas del género *Rhodococcus* que fueron obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Burjassot, España). En la Tabla 6 se muestra la especie y las condiciones de cultivo de las 5 cepas de *Rhodococcus* spp. Se indica el código CECT de cada cepa y del medio de cultivo correspondiente. En este caso, las bacterias pudieron ser cultivadas en condiciones aeróbicas.

Tabla 6. Especies de *Rhodococcus* utilizadas y condiciones de cultivo.

Especie	CECT	Medio de cultivo	Tª incubación (°C)
<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	420	YEME (ISP2) CECT 56	37
<i>Rhodococcus hoagii</i>	555	TSA CECT 20	30
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	5749	YEME (ISP2) CECT 56	30
<i>Rhodococcus rhodnii</i>	5750	TSA CECT 20	26
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	5751	YEME (ISP2) CECT 56	30

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos llevados a cabo para estudiar la adhesión fueron diferentes para cada virus. Aunque la unión entre bacterias y virus se realizó de la misma manera, la visualización de dicha interacción fue mediante técnicas distintas. En el caso de RV, la interacción se observó a través de inmunofluorescencia mientras que, para las VLPs de NoV, la técnica elegida fue el Western blot. A continuación, se describen los métodos utilizados para cada uno de ellos.

4.3. Ensayos de unión entre bacterias y rotavirus Wa

Para los ensayos entre RV y las cepas de *Ruminococcus* spp. se utilizó la cepa Wa de RV, producida tal y como se ha descrito anteriormente (apartado 2.1 de Material y Métodos). Una vez crecidas, las células de *R. gnavreaultii* DSM-19829 y *R. gnavreaultii* IPLA-NM1 fueron ajustadas a una OD₆₀₀ de 1 tras ser lavadas y diluidas en PBS 1 X (filtrado a 0,22 µm) mediante centrifugaciones de 10 min a 2.000 x g. Las células se incubaron en un volumen final de 200 µl con 100 µg/ml de RV Wa durante 1 h a 37°C y en agitación suave a 36 rpm en el agitador Intelli-Mixer™ RM-2L. Después de este período, las células se centrifugaron y lavaron dos veces con PBS 1 X para eliminar cualquier virus no unido. Las células se fijaron con 200 µl de formaldehído al 4 % en PBS 1 X y se incubaron durante 15 min a 37°C.

4.3.1. Visualización de la interacción mediante microscopía de fluorescencia

Después de la fijación, las suspensiones bacterianas se extendieron sobre portaobjetos de vidrio y se dejaron secar al aire. Los portaobjetos se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente en PBS 1 X con 1 % de BSA y los virus se detectaron mediante incubación a 37°C durante 1 h con un anticuerpo monoclonal IgG de ratón anti-RV producido en el laboratorio, seguido de un anticuerpo IgG de cabra marcado con AlexaFluor488 (Molecular Probes, Oregón, EE. UU.) a una dilución de 1:400. Las preparaciones se montaron con 10 µl del reactivo Antifade ProLong Gold (Life Technologies, California, EE. UU.) y se visualizaron con un microscopio de fluorescencia Eclipse 90i (Nikon, Tokio, Japón). Se incluyeron controles sin el virus y sin el anticuerpo primario (anti-RV). Las imágenes fueron procesadas mediante el software Fiji (Software ImageJ 1.49q, National Institutes of Health, EE. UU.).

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

4.4. Ensayos de unión entre bacterias y VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012

De la misma manera que en el caso anterior, las células de cada cepa de *Rhodococcus* spp. se lavaron y diluyeron a una OD₆₀₀ de 1. Seguidamente, 200 µl de la suspensión de bacterias se incubaron con 10 µg de VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 durante 1 h a 37°C en rotación a 36 rpm. Después de este periodo, la suspensión se centrifugó y se lavó dos veces con PBS 1 X a 2.000 x g durante 10 min.

4.4.1. Visualización de la interacción mediante Western blot

El sedimento con la fracción bacteriana fue resuspendido en 40 µl de tampón de carga 2 X (Laemmli Sample Buffer; Bio-Rad Laboratories, California, EE. UU.). Se incluyeron diluciones seriadas de VLPs como curva estándar para la cuantificación de la cantidad de VLPs unidas (ng/pocillo). Tras la transferencia líquida a 100V durante 1 h en gel al 10 % SDS-PAGE, la membrana se bloqueó con PBS-T (PBS 1 X-Tween 0,05 %) y 3 % de BSA durante 1 h a temperatura ambiente. Tras 2 lavados de 5 min con PBS-T, la membrana se incubó ON a 4°C con anticuerpo anti-VLPs de NoV GII.4 Sydney (apartado 3 de Material y Métodos) a 1:10.000 en PBS-T con 1 % de BSA. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 5 min y se incubó con anticuerpo anti-ratón HRP (Sigma-Aldrich) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras 5 lavados de 5 min, se reveló con el sustrato de la peroxidasa comercial Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad). La reacción se visualizó mediante el sistema Amersham™ ImageQuant 680 (Cytiva). La cuantificación fue realizada con el programa Fiji (Software ImageJ 1.49q). Se emplearon como medidas la media de los valores de gris obtenidos de las bandas en el gel, que se convirtieron a ng/pocillo utilizando la media de los valores de gris de las diluciones de VLPs como una línea de referencia. Los datos de ng/pocillo fueron utilizados para la elaboración de la gráfica y el análisis estadístico mediante GraphPad Prism v8.4.3.

4.4.2. Visualización de la interacción mediante microscopía electrónica de transmisión

Por otro lado, también se llevó a cabo la visualización de la interacción a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM) en la Unidad de Microscopía Electrónica y Confocal del Instituto de Salud Carlos III. En este caso se optó por realizar el ensayo de unión entre las VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 y la cepa tipo *R. rhodochrous*.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo de unión se realizó tal como se ha explicado anteriormente. Sin embargo, por requerimientos de la técnica de microscopía, se decidió incubar las VLPs con las bacterias a una OD₆₀₀ de 3. Tras los últimos lavados (eliminar las VLPs no unidas), el sedimento conteniendo las bacterias fue resuspendido en 100 µl de PBS 1 X. Posteriormente, se procedió con la preparación de la muestra para microscopía.

Se recogieron 15 µl de la suspensión anterior y se incubaron sobre rejillas de cobre recubiertas con colodión-carbón. Estas rejillas fueron ionizadas previamente mediante descarga iónica en el sistema Quorum Q150T ES (Quorum Technologies, East Grinstead, Reino Unido). Tras 5 min de incubación sobre la rejilla, se realizaron dos lavados sucesivos sobre 50 µl de agua MilliQ®. Finalmente, la muestra fue teñida durante 1 min con 5 µl de acetato de uranilo al 2 % (p/v). Para la observación de la muestra se usó un microscopio electrónico FEI Tecnai 12 equipado con un filamento de LaB6, operado a 120 kV y equipado con una cámara CCD FEI Ceta. Las imágenes fueron tomadas a una magnificación nominal de 21.000 X.

4.5. Detección de componentes similares a HBGAs expresados sobre bacterias

4.5.1. Detección de moléculas similares a HBGAs sobre *Ruminococcus gauvreauii*

Se estableció un ensayo de ELISA para determinar si las cepas de *Ruminococcus* spp. expresaban componentes similares a los HBGAs en su superficie. Se recubrieron placas de ELISA Costar™ (Corning, nueva York, EE. UU.) con las dos cepas de *R. gauvreauii* (DSM-19829 e IPLA-NM1). Como control positivo se utilizó la especie *Enterobacter cloacae* ATCC 13.047 (cultivada en caldo nutritivo a 37°C durante la noche con agitación) ya que previamente se determinó que expresa azúcares similares a los HBGAs en su superficie bacteriana¹⁰⁹. Las células bacterianas se lavaron 3 veces y se diluyeron a OD₆₀₀ de 1 en PBS 1 X. La placa de ELISA fue recubierta con 100 µl/pocillo de la suspensión bacteriana y fue incubada ON a 4°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con 200 µl/pocillo de PBS-T y se bloquearon durante 1 h a 37 °C con PBS-T y BSA al 3 %. Después del bloqueo, la placa se incubó durante 1 h a 37°C con anticuerpos monoclonales dirigidos frente a HBGAs (anti-A y anti-B, de Diagast, Loos, Francia; anti-H, anti-Le^a y anti-Le^b, de Covance, Nueva York, EE. UU.) diluidos 1:100 en PBS-T con un 1 % de BSA. Después de 3 lavados, se agregó el anticuerpo secundario (anti-ratón HRP, de Sigma-Aldrich) diluido a 1:2.000 en PBS-T con BSA al 1 % y se incubó durante 1 h a 37°C.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Tras 3 lavados con PBS-T, las reacciones se revelaron con o-fenilendiamina dihidrocloruro (OPD-Fast, de Sigma-Aldrich), se detuvieron con H₂SO₄ 2 M y se midió la absorbancia a 492 nm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los valores de absorbancia fueron utilizados para la elaboración de la gráfica y el análisis estadístico mediante GraphPad Prism v8.4.3.

4.5.2. Detección de moléculas similares a HBGA sobre *Rhodococcus* spp.

Las especies de *Rhodococcus* de la Tabla 6 fueron crecidas y ajustadas a una OD₆₀₀ de 1, tal y como se ha descrito anteriormente. Una placa de ELISA fue recubierta con 100 µl/pocillo de cultivo y mantenida ON a 4°C. Se incluyeron como control positivo 100 µl/pocillo de los azúcares correspondientes (Isosep AB., Tullinge, Suiza) a 1 µg/ml conjugados con albúmina de suero humana (HSA). Tras 3 lavados con PBS-T, la placa se bloqueó durante 1 h a 37°C con 3 % de BSA en PBS-T. Se realizaron 3 lavados y se incubó durante 1 h a 37°C con los anticuerpos monoclonales anti-HBGAs comentados anteriormente, a los que se añadieron dos más (anti-Le^x y anti-Le^y, de Covance). Después de 3 lavados se incubó durante 1 h a 37°C con el anticuerpo secundario a 1:2.000 con 1 % de BSA (anti-ratón HRT). Tras 3 nuevos lavados, las reacciones fueron desarrolladas con OPD-Fast, paradas con H₂SO₄ 2 M y reveladas a 492 nm. Para el control negativo se incubó cada pocillo de bacterias solo con el anticuerpo secundario anti-ratón HRT. El ensayo fue realizado por triplicado.

Se realizó también un ELISA con las VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 usadas en los experimentos. La placa fue tapizada con HSA conteniendo los azúcares A, B, H, Le^a, Le^b, Le^x y Le^y (Isosep AB.) (Figura 5 del apartado 2.3 de Introducción) y un control con HSA sin funcionalizar fue añadido como control negativo. Tras la incubación ON a 4°C se lavó 3 veces y se bloqueó con PBS-T con 3 % de BSA durante 1 h a 37°C. Tras 3 lavados, se incubaron las VLPs a 10 µg/ml durante 1 h a 37°C. Después de 3 lavados, se incubó con el anticuerpo anti-VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 durante 1 h a 37°C. Se procedió con 3 lavados y se mantuvo durante 1 h a 37°C con el anticuerpo secundario a 1:2.000 y 1 % de BSA (anti-ratón HRP). Tras 3 nuevos lavados, las reacciones se revelaron como se ha explicado anteriormente. Los valores de absorbancia fueron utilizados para la elaboración de la gráfica y el análisis estadístico mediante GraphPad Prism v8.4.3.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

4.6. Bloqueo de la infección de rotavirus con *Ruminococcus gauvreauii*

Para analizar el efecto de la presencia de bacterias sobre la infección de RV Wa, se utilizaron células Caco-2 diferenciadas durante 11 días. Para ello, las células se sembraron en placas de cultivo Costar™ de 96 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en medio MEM (Gibco™) suplementado con 10 % (v/v) de BSA, 1 % de aminoácidos no esenciales 100X (Gibco™) y 1 % de antibióticos (penicilina a 100 U/ml y estreptomicina a 100 µg/ml) y se incubaron hasta su diferenciación a 37°C y 5 % de CO₂, con cambios de medio de cultivo cada tres días. El experimento se realizó por triplicado y se incluyeron pocillos de control con RV Wa y sin bacterias añadidas (correspondiente al 100 % de infección).

Tras la diferenciación, las monocapas celulares se lavaron con medio MEM sin suero. Posteriormente, se agregó 100 µl de células de *R. gauvreauii* IPLA-NM1 (OD₆₀₀ de 0,01) a las células Caco-2 y se incubó durante 1 h a 37°C.

Antes de la infección, es necesario activar el virus con tripsina tipo IX (Sigma-Aldrich)¹⁷⁹. Para ello, se mezclaron 10 µl/ml de RV Wa con 1 µg/ml de tripsina tipo IX en medio sin suero y se incubó durante 30 min a 37°C. La monocapa se lavó tres veces con medio sin suero conteniendo 1 µg/ml de tripsina tipo IX y las células se infectaron con RV activado a 1.5×10^4 equivalentes de copias genómicas por pocillo (GCE/pocillo). Las partículas de RV se mantuvieron con las monocapas celulares durante 1 h a 37°C. Después de este período, se eliminó el inóculo viral, se lavaron los pocillos 2 veces con 200 µl de medio sin suero y se incubaron durante 16 h a 37°C con 200 µl/pocillo de medio sin suero con 1 µg/ml de tripsina tipo IX. Seguidamente, los virus se recolectaron con 100 µl de Triton X-100 al 1 % en PBS 1 X. Finalmente, se extrajo el ARN utilizando el kit Nucleospin-ARN virus (Macherey-Nagel, Dylan, Alemania), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los GCE/ml obtenidos después de la infección se calcularon mediante RT-qPCR¹⁸⁶, utilizando los correspondientes controles y con las muestras por triplicado (apartado 6.1 de Material y Métodos). Los datos resultantes fueron utilizados para la elaboración de la gráfica y el análisis estadístico mediante GraphPad Prism v8.4.3.

Se aprovechó el experimento para visualizar mediante fluorescencia la adhesión bacteriana a las monocapas de células Caco-2. Después de la incubación de la suspensión

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

bacteriana con las células, se fijaron y tiñeron con DAPI 10 mg/ml (Invitrogen de Thermo Fisher Scientific) diluido 1:5.000 en PBS 1 X. Se tomaron nueve imágenes Z-stack de 1 μ m a 100 X utilizando un microscopio Eclipse 90i (Nikon Corporation, Tokio, Japón). Estas pilas de imágenes se procesaron con Fiji (Software ImageJ 1.49q) y se dividieron en dos subpilas, que contenían información visual basal de la monocapa de células Caco-2 (principalmente núcleos) y las bacterias ubicadas en la parte superior, respectivamente. Ambas subpilas se procesaron por separado y finalmente se fusionaron en imágenes individuales.

4.7. Bloqueo de la adhesión de norovirus con *Rhodococcus* spp.

Con el objetivo de estudiar el efecto de las bacterias sobre la mayor o menor adhesión del virus a las células, se realizaron tres tipos de experimentos que implicaron a células HT-29M6, VLPs de NoV GII.4 Sydney y la cepa tipo *R. rhodochrous* (5749 CECT). En los tres ensayos se utilizó una concentración de VLPs de 10 μ g/100 μ l y diferentes niveles de absorbancia de bacterias (OD₆₀₀ de 0,25, 0,5 y 1), lavadas y diluidas en PBS 1 X estéril.

Las células HT-29M6 se sembraron a una densidad de 7×10^4 células/pocillo en placas Costar™ de 96 pocillos y se incubaron a 37°C en un incubador con 5 % de CO₂ hasta que alcanzaron la confluencia. Las células fueron mantenidas con medio DMEM GlutaMAX™ (Gibco™) suplementado con 1 % (v/v) de antibióticos (penicilina a 100 U/ml y estreptomycin a 100 μ g/ml), 1 % de bicarbonato de sodio (Gibco™), 1 % de L-glutamina 200 ml (Gibco™) y 10 % (v/v) de BSA.

En los tres experimentos se incluyó un control negativo (células HT-29M6 sin VLPs) y un control positivo que correspondería al 100 % de la unión (células HT-29M6 con 10 μ l/100 μ l de VLPs sin bacterias). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

A continuación, se describe cada uno de los tres experimentos. Previo a cada experimento, las células HT-29M6 fueron lavadas 2 veces con 200 μ l de PBS 1 X y fijadas durante 1 h a temperatura ambiente con 4 % de PFA. Tras 2 nuevos lavados, se procedió con cada uno de los ensayos.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

- i. Ensayo de desplazamiento: 100 μ l de VLPs a 10 μ g/100 μ l fueron añadidos al cultivo celular y mantenido ON a 4°C. Se retiró el inóculo y se añadió 100 μ l/pocillo de células bacterianas y se incubó durante 3 h a 4°C.
- ii. Ensayo de exclusión. 100 μ l de células bacterianas fueron añadidos a las células HT-29M6 e incubadas a 4°C durante 3 h. Tras retirar el inóculo, se añadieron 100 μ l de VLPs a 10 μ g/100 μ l y se incubó ON a 4°C.
- iii. Ensayo de exclusión competitiva. Se mezclaron las VLPs con las bacterias manteniendo una concentración final de VLPs a 10 μ g/100 μ l. Se añadieron 100 μ l de la mezcla a cada pocillo con las células HT-29M6 fijadas y se incubó ON a 4°C.

Finalmente, tras un lavado con 200 μ l de PBS 1 X, las VLPs unidas a las células HT-29M6 fueron recolectadas con 50 μ l de tampón de carga 2 X y las VLPs fueron detectadas por Western blot, siguiendo el mismo protocolo que se realizó para la medición de la interacción entre *Rhodococcus* y las VLPs (apartado 4.4.1 de Material y Métodos). En este caso, se incluyeron en el Western blot los triplicados de cada uno de los experimentos. De nuevo, la cuantificación fue realizada tomando como datos la media de valores de gris extraídos de las bandas del gel, mediante el programa Fiji (Software ImageJ 1.49q).

5. Estudio del papel de la microbiota en la infección por rotavirus y norovirus humanos en un modelo murino

5.1. Preparación de la microbiota para el trasplante fecal

En el experimento de infección de ratones con RV Wa y NoV GII.4 Sydney 2012 [P16] se incluyeron grupos con trasplante de microbiota a partir de heces (FMT, por sus siglas en inglés). En el caso del FMT humano (hFMT), se recolectaron heces de 4 niños lactantes, de entre 1 y 3 meses de edad, cuyos padres firmaron el consentimiento informado. Los criterios de inclusión elegidos fueron que estuvieran sanos (ausencia de síntomas de infección), no hubieran recibido ningún tratamiento con antibióticos ni probióticos y que se alimentaran exclusivamente de leche materna. Para el autotrasplante de heces de ratón (self-FMT), se recolectaron heces de los propios ratones previamente al experimento de infección.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de heces (de ratón y de humano) se recolectaron en frascos anaeróbicos con bolsas de generación de gas anaerobio del sistema Oxoid AnaeroGen™ (Thermo Fisher Scientific). Tras la recolección, se almacenaron inmediatamente a 4°C y se criopreservaron en las siguientes 12 h siguiendo un protocolo descrito previamente, con algunas modificaciones¹⁸⁷. El medio de criopreservación contenía un 80 % de medio de infusión de cerebro-corazón (BHI 2 X, Pronadisa, Madrid, España) suplementado con 0,1 % de cisteína y 20 % de leche desnatada (200 g/l) (Scharlab, Barcelona, España). Las heces se diluyeron en el medio de criopreservación en una proporción de 1:2 (v/v) y se almacenaron en alícuotas a - 80°C.

5.2. Procedimiento experimental con ratones

En los experimentos se utilizaron cuatro grupos de cinco ratones hembra C57BL/6J de 6 semanas de edad adquiridos de los laboratorios Charles River (Saint Germain Nuelles, Francia). En la Figura 15 se muestra un resumen del diseño experimental realizado con ratones, común para los ensayos con RV y NoV. Cada uno de los grupos fue mantenido en jaulas independientes.

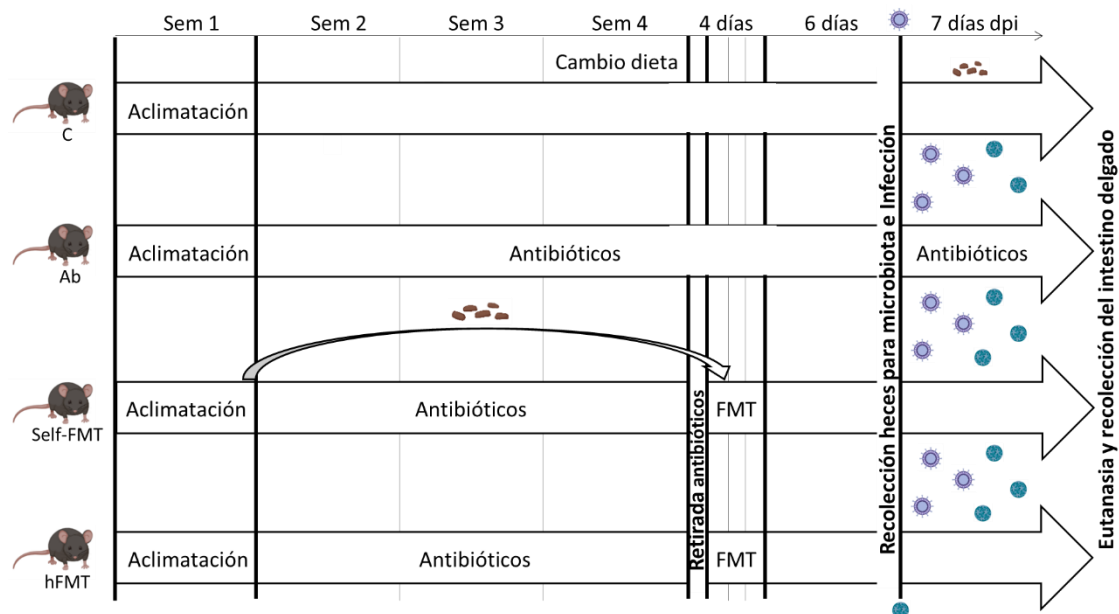


Figura 15. Diseño experimental realizado con ratones. Se muestra una representación cronológica de cada una de las intervenciones realizadas. La población la componen 4 grupos de ratones de 5 ratones/grupo. C: grupo control sin tratamiento; Ab: grupo tratado con antibióticos durante todo el experimento; self-FMT: grupo con autotrasplante de microbiota murina; hFMT: grupo con trasplante de microbiota humana. FMT: trasplante de microbiota; sem: semana; dpi: días post-infección.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Los grupos Ab (tratamiento con antibióticos durante todo el experimento), self-FMT y hFMT recibieron un tratamiento con antibióticos compuesto por una mezcla de 1 g/l de ampicilina, 1 g/l de metronidazol, 1 g/l neomicina y 0,5 g/l de vancomicina, tal y como se ha descrito en otro trabajo¹⁸⁸. Los antibióticos fueron incluidos en el agua de bebida durante 3 semanas, renovándose cada 3 días. Para determinar el número de bacterias viables en las heces de los ratones (medidas como unidades formadoras de colonia o UFC por gramo de heces), se recolectaron muestras al comienzo del experimento y el día antes de la infección, y se realizaron diluciones seriadas en medio BHI suplementado con 0,1 % de cisteína. Las diluciones se sembraron en medio de Wilkins-Chalgren (Sigma-Aldrich) conteniendo 1,5 % de agar y se incubaron en condiciones anaeróbicas (AnaeroGen de Thermo Fisher Scientific) a 37°C durante 48 h. Previo a la inclusión de antibióticos, se recolectaron heces del grupo self-FMT y se procesaron y preservaron, tal y como se ha explicado anteriormente, para realizar el autotrasplante más adelante (final de la semana 4). A los grupos self-FMT y hFMT se les eliminó el tratamiento de antibióticos 24 h antes del trasplante. La última semana antes del FMT, se modificó la dieta de los ratones, pasando de un pienso estándar a otro purificado y libre de microorganismos con bajo contenido en azúcares (AIN-93G de Envigo, Barcelona, España). El grupo control (C) no recibió ningún tratamiento.

El trasplante de microbiota fue realizado durante 3 días consecutivos por vía oral con sonda orofaríngea, tal y como se ha descrito anteriormente¹⁸⁹. En resumen, los grupos self-FMT y hFMT recibieron 100 µl de un preparado de materia fecal (heces en medio BHI en proporción 1:2) por ratón cada día.

A los 6 días del trasplante, se recolectaron heces de cada uno de los ratones con el objetivo de analizar el perfil de microbiota de cada grupo. Además, se midió la concentración bacteriana a partir de la cuantificación del ADNr 16S mediante qPCR (apartado 7 de Material y Métodos).

Ese mismo día, se realizó la infección con el virus correspondiente. Con respecto a RV, con la cuantificación por unidades de focos fluorescentes (FFU, por sus siglas en inglés), en la que se determinó la cantidad de partículas infectivas, se obtuvo un resultado de $1,6 \times 10^8$ FFU/ml mientras que por RT-qPCR fue de $1,6 \times 10^{11}$ GCE/ml. La

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

ausencia de un método de cultivo para NoV nos impidió evaluar la concentración de partículas infectivas. Por tanto, finalmente, cada ratón fue infectado vía oral con $1,6 \times 10^{10}$ GCE de RV Wa ($1,6 \times 10^7$ de partículas infectivas, en el ensayo de focos fluorescentes) o $1,8 \times 10^7$ GCE de NoV GII.4 Sydney 2012 [P16], contenidos en 100 μ l de TNC o PBS, respectivamente. Las muestras de heces para monitorizar la infección fueron recolectadas cada día durante los 7 días tras la infección (dpi) y mantenidas a - 20°C hasta su uso. A los 7 días, todos los ratones fueron sacrificados y el intestino delgado de cada ratón fue conservado en RNAlater (Sigma-Aldrich) a - 80°C hasta su análisis.

5.3. Nivel de expresión de biomarcadores inmunológicos y *Fut2*

Se examinó el efecto de los tratamientos (antibióticos y FMT) así como de la infección sobre la expresión de biomarcadores inmunológicos y del gen de la fucosiltransferasa FUT2. Para ello, se procedió con la extracción del ARN mensajero (ARNm) del tejido del intestino delgado (aislado a los 7 dpi) y la cuantificación del nivel de expresión mediante qPCR. El estudio inmunológico se realizó sobre los genes que codifican citoquinas proinflamatorias (*Il1 β* , *Il6*, *Cxcl15* (*IL8*), *Il12*, *Tnf α* , *Ifn γ*) y antiinflamatorias (*Il4*, *Il10*, *Il13*), así como el receptor tipo *Toll 2* (*Tlr2*).

Se trituró y homogenizó un fragmento de 100 mg de tejido del intestino delgado de cada uno de los ratones en 1 ml de TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific) utilizando un homogeneizador Polytron PT10-35 GT (Thermo Fisher Scientific), con 3 pulsos de 10 s – 5 s. Seguidamente, se añadieron 200 μ l de cloroformo y fue mantenido durante 15 min, con agitaciones cada 5 min. Se centrifugó a 16.000 x g a 4°C durante 15 min y el sobrenadante (ARNm) fue mezclado con 500 μ l de isopropanol y mantenido durante 10 min a temperatura ambiente. El precipitado fue lavado con 1 ml de etanol al 75 % en agua tratada con DEPC mediante centrifugación de 10 min a 16.000 x g. Finalmente, se resuspendió en 150 μ l de agua DEPC.

La concentración y pureza del ARN se midió en el instrumento NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). El ARN se ajustó a 1 μ g/ μ l y se trató con 1 U de DNasa I (Sigma-Aldrich) por cada 1 μ g de ARN para eliminar el ADN contaminante. A continuación, 1 μ g de ARN fue retrotranscrito a ADNc siguiendo el protocolo descrito anteriormente (apartado 1.2 de Material y Métodos). Posteriormente, se evaluaron los niveles de los

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

distintos biomarcadores mediante el sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando los correspondientes cebadores (Tabla 7). En todas las reacciones se incluyeron controles negativos y se procesaron con triplicados. Los genes de expresión *Gapdh* y *Rplp0* murinos se utilizaron como genes de referencia.

Tabla 7. Información de las secuencias de los cebadores usados en la qPCR de expresión de los biomarcadores inmunológicos. *Cebadores de genes de referencia.

Diana	Cebador	Secuencia 5' → 3'	Posición nucleótidos	Referencia
<i>Il1β</i>	IL-1β-F	TCGCTCAGGGTCACAAGAAA	995-1014	190
	IL-1β-R	CATCAGAGGCAAGGAGGAAAAC	1067-1046	
<i>Il4</i>	IL-4-F	GGTCTCAACCCCCAGCTAGT	63-82	191
	IL-4-R	GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT	164-142	
<i>Il6</i>	IL-6-F	CTGCAAGAGACTTCCATCCAGTT	92-114	190
	IL-6-R	GAAGTAGGGAAGGCCGTGG	161-143	
<i>Cxcl15 (IL8)</i>	IL-8-F	CAGGCCACAGACGGACATG	22-40	190
	IL-8-R	GGACGAAGATGCCTAGGTTAAGG	98-76	
<i>Il10</i>	IL-10-F	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	97-117	190
	IL-10-R	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG	201-182	
<i>Il12 (IL12p40)</i>	IL-12-F	AGCACCAGCTTCTTCATCAGG	720-740	192
	IL-12-R	CCTTTCTGGTTACACCCCTCC	931-911	
<i>Il13</i>	IL-13-F	CCTGGCTCTTGCTTGCTT	92-110	191
	IL-13-R	GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA	207-187	
<i>Tnfα</i>	TNF-α-F	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	298-318	190
	TNF-α-R	TGGGCTACAGGCTTGCTACT	448-429	
<i>Infy</i>	INF-γ-F	CATTCATGAGTATTGCCAAGTTTG	444-467	193
	INF-γ-R	GCTGGATTCCGGCAACAG	547-530	
<i>Tlr2</i>	TLR2-F	GTCTCTGCGACCTAGAAGTGGA	162-183	194
	TLR2-R	CGGAGGGAATAGAGGTGAAAGA	497-476	
<i>Tlr4</i>	TLR4-F	AGCAGAGGAGAAAGCATCTATGATGC	2277-2302	194
	TLR4-R	GGTTTAGGCCCCAGAGTTTTTCTCC	2816-2797	
*<i>Gapdh</i>	GAPDH-F	AGCTTGTCATCAACGGGAAG	283-302	190
	GAPDH-R	TTTGATGTTAGTGGGGTCTCG	344-324	
*<i>Rplp0</i>	RPLP0-F	AGATTCGGGATATGCTGTTGGC	411-432	195
	RPLP0-R	TCGGGTCTAGACCAAGTGTC	519-499	

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

La mezcla de reacción se puede observar en la Tabla 8. El programa térmico fue de 10 min a 95°C de desnaturalización inicial, seguido de 45 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C.

Tabla 8. Mezcla de reacción de qPCR para la cuantificación de la expresión de biomarcadores inmunológicos.

Reactivo y casa comercial	Concentración inicial	Volumen final (μl/muestra)
NZY Speedy qPCR Green Master Mix 2X (NZYtech)	2X	5
Cebador directo (IDT)	10 μM	0,4
Cebador reverso (IDT)	10 μM	0,4
Agua MilliQ®		2,2
ADNc		2
Volumen total (μl/muestra)		10

También se analizó la expresión de *Fut2* mediante qPCR. En este caso, el gen de expresión *HPRT* murino se utilizó como gen de referencia. La preparación de los cebadores y sondas fue adquirida del proveedor de ácidos nucleicos IDT (Integrated ADN Technologies Inc. Iowa, EE. UU.) con los siguientes identificadores: Mm.PT.58.50508299 (*FUT2*) y Mm.PT.39a.22214828 (*HPRT*).

Se utilizó el mismo sistema y condiciones térmicas de qPCR que el empleado para la cuantificación de la expresión de biomarcadores inmunológicos. En la Tabla 9 se presenta la mezcla de reacción de qPCR.

Tabla 9. Mezcla de reacción de qPCR para la cuantificación de la expresión de la glicosiltransferasa *Fut2*.

Reactivo y casa comercial	Concentración inicial	Volumen final (μl/muestra)
NZYSpeedy qPCR Probe Master Mix (NZYTech)	2 X	5
Mix cebador y sonda (IDT)	40 X	0,5
Agua MilliQ®		2,5
ADNc		2
Volumen total (μl/muestra)		10

La linealidad y la eficiencia de amplificación se determinaron para cada par de cebadores utilizando el software LinRegPCR¹⁹⁶. Los valores de expresión relativa se calcularon utilizando la herramienta de software de Expresión Relativa REST 2009

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

(Qiagen, Hilden, Alemania)¹⁹⁷. Esta herramienta calcula la diferencia de expresión de un determinado gen entre diferentes grupos de estudio. Para ello, se toman los valores de la media del Ct obtenido en la qPCR, utilizando el resultado del gen de referencia y la eficiencia de amplificación.

Los valores obtenidos en esta herramienta (nivel de expresión, error estándar, índice de confianza al 95 % y valor de significancia) fueron utilizados en la aplicación GraphPad Prism v8.4.3 para elaborar las gráficas.

6. Cuantificación de la carga viral

En este apartado se describe el procedimiento llevado a cabo para cuantificar la carga viral de la obtención de la reserva de partículas de RV Wa y de NoV GII.4 Sydney 2012 (apartado 2.1 y 2.2 de Material y Métodos), así como el nivel de excreción tras la infección de los ratones (apartado 5.2 de Material y Métodos). En todos los casos se utilizaron triplicados y se incluyeron controles negativos y positivos. La extracción de ARN viral fue mediante el Kit NucleoSpin® ARN Virus (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de las heces de los ratones, éstas se pesaron y diluyeron en 350 µl del reactivo RAV1 del Kit de extracción. La cuantificación de la excreción viral en los ratones se midió en GCE/g de heces. Los datos de GCE/g de heces fueron utilizados en la herramienta GraphPad Prism v8.4.3 para la elaboración de las gráficas y su análisis estadístico.

6.1. Cuantificación de rotavirus Wa

Tras la extracción del ARN viral, se procedió a su cuantificación por RT-qPCR usando los cebadores JVKF/JVKR (JVKF, CAGTGGTTGATGCTCAAGATGGA, nt 17–39; JVKR, TCATTGTAATCATATTGAATACCCA, nt 147–123) y la sonda TaqMan® JVKP (FAM-ACAACTGCAGCTTCAAAGAAGWGT-BHQ1, nt 96–72)¹⁸⁶. En el proceso de cuantificación se utilizó como curva estándar diluciones decimales seriadas de un plásmido comercial con la secuencia *NSP3* del prototipo Wa (IDT).

En la Tabla 10 se describe la mezcla de reacción para la cuantificación mediante RT-qPCR. La amplificación fue realizada en un termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

System (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: desnaturalización a 97°C seguido de la reacción de transcripción reversa durante 30 min a 50°C, desnaturalización inicial durante 10 min a 95°C seguida de 45 ciclos de 15 s de desnaturalización a 95°C y 1 min de hibridación a 60°C (recogida de datos de fluorescencia).

Tabla 10. Mezcla de reacción para la cuantificación de rotavirus mediante RT-qPCR.

Reactivo y casa comercial	Concentración inicial	Volumen final (µl/muestra)
NZYSpeedy qPCR Probe Master Mix (NZYTech)	2 X	5
Cebador JVKF (IDT)	10 µM	0,25
Cebador JVKR (IDT)	10 µM	0,25
Sonda JVKP (IDT)	10 µM	0,25
SuperScript® (Invitrogen)	5 U/µl	0,1
Agua DEPC Ultrapure (Invitrogen)		3,15
ARN/ADN curva patrón		1
Volumen total (µl/muestra)		10

6.2. Cuantificación de norovirus GII.4 Sydney 2012

La carga viral de NoV fue cuantificada usando una mezcla de los cebadores COG2F/COG2R a 20 µM (COF2F, CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG, nt 5003–5029; COF2R, TCGACGCCATCTTCATTCACA, nt 5080–5100) y la sonda RING2-TP a 10 µM (RING2-TP, FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-BHQ1)¹⁸².

La mezcla de reacción se puede visualizar en la Tabla 11. La amplificación fue realizada con las siguientes condiciones: desnaturalización a 65°C seguida de la reacción de transcripción reversa durante 30 min a 50°C, desnaturalización inicial durante 10 min a 95°C seguida de 45 ciclos de 15 s de desnaturalización a 95°C y 1 min de hibridación a 60°C (recogida de datos de fluorescencia).

En el proceso de cuantificación se utilizaron diluciones decimales seriadas de un plásmido de ADN comercial (IDT) con la secuencia VP1 de NoV GII como curva estándar.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 11. Mezcla de reacción para la cuantificación de norovirus GII mediante RT-qPCR.

Reactivo y casa comercial	Concentración inicial	Volumen final (µl/muestra)
NZYSpeedy qPCR Probe Master Mix (NZYTech)	2 X	5
Mix cebador y sonda (IDT)	40 X	0,2
SuperScript® (Invitrogen)	5 U/µl	0,1
Agua DEPC Ultrapure (Invitrogen)		2,8
ARN/ADN curva patrón		2
Volumen total (µl/muestra)		10

7. Extracción y cuantificación del ADN ribosomal 16S

7.1. Extracción de ADN total

El procedimiento de extracción de ADN fue el mismo para el análisis metagenómico (bacterias que unen virus en muestras clínicas y microbiota de los ratones) y para la cuantificación de bacterias totales tras la aplicación de los tratamientos (antibióticos y FMT) en el experimento con ratones.

El ADN total se aisló utilizando el kit de purificación Masterpure™ DNA purification Kit (Epicentre Technologies Corporation, Madison, EE. UU.), con ligeras variaciones. Los 100 µl de cada muestra fueron incubados durante 40 min a 37°C con tampón de lisis (300 µl de la solución Mastermix Tissue and Cell Lysis, 1 µl de mutanolisina 10 U/ml y 2 µl de lisozima 20 mg/ml). Posteriormente, se mezcló en un tubo con tapón de rosca de 2 ml con 0,5 ml de microesferas de vidrio y fueron lisadas en el sistema de lisis y trituradora de gránulos FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Alemania) mediante 2 ciclos de 1 min y 30 s. Seguidamente, se añadió 2 µl de proteinasa K 18,5 mg/ml (Roche, Basilea, Suiza) y se incubó durante 20 min a 65°C con agitación cada 5 min. Tras enfriarlo en hielo, se mezcló con 1 µl de RNasa A 5 mg/ml y se incubó durante 60 min a 37°C. Se volvió a enfriar y se mezcló durante 10 s en vórtex con 155 µl del reactivo de precipitación de proteínas del kit. Se centrifugó a 16.000 x g durante 10 min y el sobrenadante fue incubado y mezclado con 500 µl de isopropanol. El ADN se precipitó durante 10 min a 16.000 x g y se procedió al lavado con etanol. Primero se mezcló con 500 µl de etanol al 70 % (v/v) y se precipitó durante 5 min a 16.000 x g. Después se añadieron 500 µl de etanol al 96 % (v/v) y se centrifugó para precipitar el

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

ADN. Tras dejarlo secar, se resuspendió en 50 µl de agua MilliQ®. La concentración del ADN fue medida y normalizada usando el fluorómetro Qubit® 3.0 (Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.). El ADN extraído fue almacenado a - 20°C hasta su utilización.

7.2. Cuantificación de bacterias totales

Para medir la concentración bacteriana (medida como GCE del ADNr 16S/g de heces) de cada grupo de ratones (Control, Ab, self-FMT y hFMT) se realizó una qPCR con cebadores universales dirigidos al gen ADNr 16S (S*-Univ-0515-a-S-19, GTGCCAGCMGCCGCGGTAA, nt 515-533 y S*-Univ-0789-a-S-18, GCGTGGACTACCAGGTATCT, nt 768-789)¹⁹⁸. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. La carga bacteriana se calculó mediante la comparación con los valores obtenidos a partir de una curva estándar. La curva estándar se preparó utilizando diluciones seriadas de ADN extraído de una suspensión bacteriana que contenía 6×10^{11} células/µl. La amplificación fue realizada en el termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial durante 10 min a 95°C seguida de 40 ciclos de 15 s de desnaturalización a 95°C y 1 min de hibridación a 62°C (recogida de datos de fluorescencia). La mezcla de reacción se describe en la Tabla 12.

De nuevo, los datos obtenidos de GCE del ADNr 16S/g de heces fueron utilizados en la herramienta GraphPad Prism v8.4.3 para la elaboración de las gráficas y su análisis estadístico.

Tabla 12. Mezcla de reacción para la cuantificación de bacterias en los 4 grupos de ratones. Se utilizan cebadores universales dirigidos al gen ADNr 16S.

Reactivo y casa comercial	Concentración inicial	Volumen final (µl/muestra)
NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (NZYTech)	2 X	5
Cebador S*-Univ-0515-a-S-19 (IDT)	10 µM	0,4
Cebador S*-Univ-0789-a-S-18 (IDT)	10 µM	0,4
Agua MilliQ®		2,2
ADN		2
Volumen total (µl/muestra)		10

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

8. Secuenciación y análisis de la microbiota

La secuenciación se realizó sobre la región V3-V4 del gen ADNr 16S, presente en el genoma bacteriano. Esta región es altamente conservada entre especies bacterianas y a la vez variable, lo cual nos permite distinguir entre diferentes grupos bacterianos.

En los experimentos de interacción entre bacterias y virus (apartado 4 de Material y Métodos), el objetivo principal de la secuenciación fue identificar qué grupos bacterianos unen RV y NoV en las muestras clínicas. Posteriormente, se seleccionaron esas bacterias para realizar los distintos experimentos de unión con RV Wa y con las VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012. Finalmente se evaluó el efecto en la infección (RV) o adhesión (VLPs de NoV) sobre el cultivo celular. En el caso del experimento con ratones (apartado 5 de Material y Métodos), el objetivo principal de la secuenciación fue analizar el perfil de la microbiota que llevaba a una mayor o menor susceptibilidad a la infección por RV y NoV.

Todo el proceso de amplificación, creación de la librería, secuenciación y revisión de su calidad fue realizada por el servicio de secuenciación de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica (FISABIO, Valencia), en el caso del experimento de interacción de bacterias con RV; y por el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE, Universitat de València), en el experimento de interacción de bacterias con NoV y en el de ratones. La plataforma utilizada en ambos servicios fue MiSeq-Illumina (Illumina, San Diego, California, EE. UU.), siguiendo el mismo protocolo recomendado por el fabricante. Después de la amplificación del ADNr 16S, se realizó una etapa de multiplexado con el kit Nextera XT Index (Illumina). Los amplicones se verificaron con un chip de ADN (Bioanalyzer 1000), y las librerías se secuenciaron utilizando una corrida pareada de 2 x 300 pb (MiSeq Reagent kit v3 de Illumina).

Los datos se demultiplexaron (generación de archivo fastq) fueron obtenidos utilizando el programa bcl2fastq© de Illumina y las lecturas se verificaron en cuanto a calidad, se les recortaron los adaptadores y se filtraron utilizando las herramientas AfterQC y FastQC v0.11.8 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk>). Las lecturas filtradas se verificaron en busca de secuencias quiméricas y las no quiméricas se

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

procesaron utilizando el software QIIMETM V1.9.1¹⁹⁹. Las secuencias químéricas se eliminaron de las lecturas utilizando el algoritmo USEARCH 6.1. Las secuencias resultantes se agruparon al 97 % de identidad en unidades taxonómicas operativas (OTU, por sus siglas en inglés) utilizando el clasificador UCLUST y las secuencias representativas se clasificaron taxonómicamente según la base de datos Greengenes 16S rRNA (versión 13.8) utilizando PyNAST. Se obtuvo así una tabla taxonómica (a nivel de OTU) con la frecuencia de cada secuencia individual contenida en cada muestra. Se eliminaron del conjunto de datos las secuencias que no pudieron clasificarse para nivel de dominio o que lo hicieron como cianobacterias y cloroplastos. Para el análisis de los datos, se transformó la tabla taxonómica en un archivo con formato *biom* con la herramienta Qiime Tool Exports, compatible con la mayoría de las herramientas de análisis de microbioma.

Por último, los datos correspondientes al análisis del microbioma fueron obtenidos con la opción de “Análisis de datos de recuento de genes marcadores” de la plataforma en línea MicrobiomeAnalyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>)²⁰⁰. Esta herramienta nos permite llevar a cabo diversas tareas de análisis, incluyendo: análisis de diversidad, visualización de datos (ayudan a interpretar la estructura de las comunidades microbianas y las diferencias entre las muestras), clasificación taxonómica (permite conocer los tipos de microorganismos presentes en las muestras), análisis de diferencias (identificar diferencias significativas en la composición microbiana entre grupos o condiciones experimentales), comparaciones entre grupos (identificar patrones o diferencias en la composición microbiana en función de diferentes variables).

Tras volcar los datos a la plataforma, se realizó un nuevo filtrado para eliminar las características de baja calidad o no informativas con el objetivo de mejorar el análisis estadístico posterior. En primer lugar, se incluyeron aquellos OTU con más de 2 lecturas y se eliminaron los taxones que aparecieron en sólo una muestra por ser considerados artefactos. Los datos fueron normalizados mediante rarefacción al tamaño mínimo de la librería y se normalizaron mediante escalado a la suma total de cuadrados (TSS, por sus siglas en inglés). Los datos de abundancia referidos en esta tesis corresponden al número de lecturas de cada taxon tras rarefaccionar los datos al mínimo de la librería.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Análisis metagenómico de las bacterias que interaccionan físicamente con rotavirus y norovirus

Para la identificación de las bacterias que interactúan con los virus, nos basamos en el Análisis de Discriminación Lineal por Efecto del Tamaño (LEfSe, por sus siglas en inglés). Se trata de un método estadístico que nos permite identificar aquellos taxones que muestran diferencias significativas entre los distintos tratamientos. El LEfSe combina el Análisis de Discriminación Lineal (LDA, por sus siglas en inglés) y las pruebas estadísticas de diferencia para determinar qué taxones son los mayores responsables de la separación entre grupos. El método asigna una puntuación LDA a cada grupo bacteriano, que representa la contribución relativa de ese taxón en la discriminación entre grupos. Una puntuación LDA positiva indica una mayor abundancia o presencia de un taxon en un grupo en comparación con otros grupos, mientras que una puntuación LDA negativa indica lo contrario.

Por tanto, se analizaron las diferencias en la abundancia entre los grupos que unen y no virus, atendiendo a aquellos géneros con diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($p < 0,05$ en test de Kruskal-Wallis, ajustado por la tasa de descubrimientos falsos o FDR, por sus siglas en inglés). Para realizar los experimentos de interacción, se tuvo en cuenta el género bacteriano con mayor puntuación LDA. Este análisis puede discriminar aquellos taxones cuya abundancia contribuye de manera significativa a las diferencias entre las muestras. Además, también nos brinda la oportunidad de visualizar las diferencias entre los tratamientos que no arrojaron resultados significativos. De esta manera, podemos considerar la selección de un taxón que consideremos relevante para nuestro estudio.

Es importante recordar que, en el caso del estudio con RV, se examinaron dos tipos de poblaciones: bacterias con virus adherido (fluorescentes) y bacterias sin virus (no fluorescentes). En este caso, se representó la relación de aumento de la abundancia entre las bacterias que unen RV y las que no. En cuanto al experimento con NoV, se separaron en cuatro poblaciones bacterianas distintas: bacterias totales (T), bacterias reconocidas por el anticuerpo control de isotipo IgG (C), bacterias no reconocidas por el anticuerpo control de isotipo IgG ni por el anticuerpo específico (N) y bacterias reconocidas por el anticuerpo anti-VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 (NoV).

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Por tanto, se extrajeron los datos de abundancia de los géneros más relevantes o con mayor puntuación LDA y se utilizaron en la herramienta estadística Graphpad Prism v8.4.3 para su visualización y análisis estadístico. Se identificaron los posibles *outliers* y éstos fueron eliminados del análisis.

8.2. Análisis metagenómico de la microbiota relacionada con la susceptibilidad de los ratones a la infección por rotavirus y norovirus

Tras los distintos tratamientos realizados a los ratones (antibióticos y FMT), analizamos las diferencias en la composición microbiana de cada grupo de ratones con el objetivo de confirmar la efectividad de los tratamientos. Para ello, se utilizó el análisis de coordenadas principales (PCoA, por sus siglas en inglés) de diversidad beta, a nivel de OTU, el cual usa la matriz de distancia Bray-Curtis²⁰¹. Esta técnica nos proporciona una visión de cómo se relacionan las muestras en función de su composición biológica. Cada muestra se representa como un punto en un espacio multidimensional, y la distancia entre estos puntos refleja el grado de similitud o diferencia entre las muestras. Las muestras que se encuentran cerca en el gráfico tienen una composición biológica más similar, como sería de esperar en aquellas que han sido sometidas al mismo tratamiento, mientras que las muestras que están más separadas son más diferentes entre sí. Una vez determinada la efectividad de los diversos tratamientos, analizamos el perfil de la comunidad microbiana establecida en cada uno de los grupos de ratones. Esto implicó la extracción de gráficos que mostraban la abundancia relativa (medida en porcentaje) de los distintos taxones en cada uno de los tratamientos, a niveles de filo, familia y género.

Con el propósito de examinar la conexión de la abundancia y diversidad microbiana con la susceptibilidad a la infección, tras analizar la relación entre la concentración bacteriana y la infección, llevamos a cabo un análisis de diversidad alfa a nivel de OTU utilizando los índices Chao1 y Shannon^{202,203}. El índice Chao1 considera la cantidad o abundancia de los taxones presentes en cada muestra, mientras que el índice Shannon calcula la diversidad teniendo en cuenta tanto la cantidad de taxones como la uniformidad en la distribución de estos en la muestra.

Para la identificación de biomarcadores bacterianos responsables de cada tratamiento, nos basamos en los resultados del LEfSe, seleccionando aquellos taxones

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

con puntuaciones LDA superiores a 2. Los diferentes diagramas de caja presentados en los resultados representan el número de lecturas de cada taxon normalizado por TSS (datos en escala logarítmica en base 2).

9. Análisis de correlación de Pearson

Finalmente, para llevar a cabo los análisis de correlación, se consideraron los datos a nivel individual y se realizaron utilizando la herramienta GraphPad Prism v8.4.3. A continuación, se detallan los datos utilizados en los análisis de correlación.

- Determinación de grupos bacterianos.

Se procedió a la extracción del ADN total a partir de las muestras de heces clínicas y de las heces de los ratones. Posteriormente, se realizó la secuenciación del ADNr 16S y se efectuó un análisis utilizando la herramienta MicrobiomeAnalyst. Los datos de abundancia (número de lecturas) se emplearon para la generación de gráficos que representan los géneros que establecen interacciones físicas con los virus (apartado 4 de Material y Métodos) y para identificar los taxones que caracterizan la microbiota de cada uno de los ratones (apartado 5 de Material y Métodos). El número de lecturas fue utilizado para establecer la correlación entre la abundancia de los diferentes taxones bacterianos y el nivel de excreción viral a las 48 h.

- Nivel de excreción viral en ratones infectados con RV y NoV.

Los datos obtenidos de la cuantificación de virus mediante RT-qPCR fueron convertidos a GCE/g, tal y como se detalla en el apartado 6 de Material y Métodos.

- Cuantificación de bacterias totales en las heces de los ratones.

Las bacterias totales de cada grupo de ratones fueron determinadas tras la aplicación de los distintos tratamientos (antibióticos y FMT) y antes de la infección viral. La cuantificación se realizó mediante qPCR dirigida al gen ADNr 16S y los datos fueron transformados a GCE/g de heces. Se utilizaron los datos a nivel individual para el análisis de correlación con el nivel de excreción viral.

- Nivel de expresión de biomarcadores inmunológicos y *Fut2* en ratones infectados con RV y NoV.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Se extrajo el ARN del intestino delgado de los ratones (a los 7 dpi) y el nivel de expresión relativa de cada gen fue calculado mediante qPCR usando los genes de referencia *Gapdh* y *Rplp0* (para los biomarcadores inmunológicos) y *Hprt* (para *Fut2*). Los datos numéricos utilizados en el análisis de correlación fueron el resultado de calcular la diferencia entre el valor de Ct promedio de cada muestra y el valor de Ct promedio de su gen de referencia correspondiente.

VIII.RESULTADOS



VIII. RESULTADOS

1. Identificación de los miembros de la microbiota que interaccionan físicamente con rotavirus y norovirus en humanos

1.1. Rotavirus

1.1.1. Determinación de bacterias que unen rotavirus A G1P[8]

Se analizaron muestras de heces de cinco niños con diarrea causada por RVA G1P[8] con el objetivo de identificar los grupos bacterianos que interactúan con el virus.

Para ello, se llevó a cabo la separación celular por citometría de flujo mediante FACS utilizando un anticuerpo anti-RV marcado con FITC, permitiéndonos identificar y aislar células bacterianas individuales basándose en su interacción con RV en muestras clínicas. Concretamente, se obtuvieron dos tipos de poblaciones de bacterias: población que une (fluorescente) y que no une RV (no fluorescente).

Se aisló ADN total de ambas poblaciones bacterianas y se determinó su composición microbiana mediante secuenciación del ADNr 16S. La información a nivel de género se seleccionó para analizar las diferencias en la abundancia relativa de cada grupo bacteriano (bacterias que unen y que no unen RV).

Basándose en el análisis, el estudio identificó los géneros *Ruminococcus* y *Oxalobacter* como posibles bacterias que unen RV (Figura 16). La abundancia relativa de *Ruminococcus* spp. resultó ser más de cinco veces mayor en el grupo que une RV en comparación con el grupo que no une. En el caso de *Oxalobacter*, este género mostró una relación de abundancia relativa de más de cuatro veces en las bacterias que unen RV. Sin embargo, es importante tener en cuenta que hubo una gran variabilidad entre las muestras, principalmente influenciada por diferencias individuales.

VIII. RESULTADOS

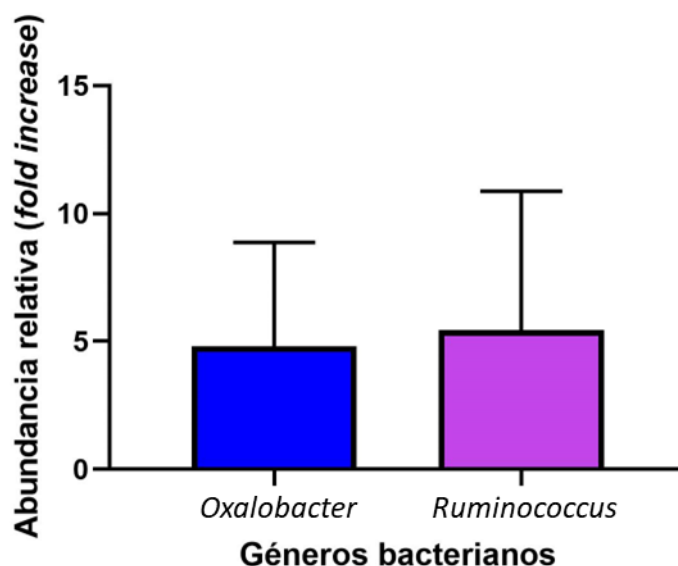


Figura 16. Bacterias que unen rotavirus G1P[8]. Se muestra el aumento en la abundancia relativa de bacterias marcadas con FITC (géneros *Oxalobacter* y *Ruminococcus*, bacterias ligadas a RV) en comparación con bacterias no marcadas (bacterias no ligadas a RV). La imagen muestra la media de las réplicas ($n=5$) $\pm$ SD.

1.1.2. *Ruminococcus gauvreauii* se une a rotavirus Wa *in vitro*

El hecho de que los resultados de la secuenciación revelaran a *Ruminococcus* como un género bacteriano con potencial de unión al RV atrajo nuestra atención por dos razones diferentes: (i) este género se asoció con niveles más bajos de anticuerpos anti-RV en adultos humanos¹⁴² y (ii) *R. gauvreauii* fue aislada recientemente de la vesícula biliar humana¹⁸⁵, mostrando que se encuentra presente también en el intestino delgado (sitio de replicación viral) y no únicamente en el colon de los animales. Por lo tanto, llevamos a cabo un análisis de la interacción entre RV y el género *Ruminococcus* utilizando dos cepas de *R. gauvreauii*: la cepa tipo DSM-19829, aislada de heces humanas, y la cepa IPLA-NM1, un aislado de bilis humana¹⁸⁵. Utilizamos la cepa Wa de RV, un HRV adaptado a cultivo con el genotipo G1P[8], que es el mismo genotipo presente en las muestras de diarrea seleccionadas. Ambas cepas bacterianas mostraron capacidad para unirse a RV, como se confirmó mediante microscopía de fluorescencia. En la Figura 17 se muestra la unión de RV a la cepa *R. gauvreauii* DSM-19829. Resulta interesante observar que, al incorporar virus a las muestras bacterianas, también se promovió cierto grado de aglomeración bacteriana, lo que sugiere que RV puede inducir la formación de agregados bacterianos.

VIII. RESULTADOS

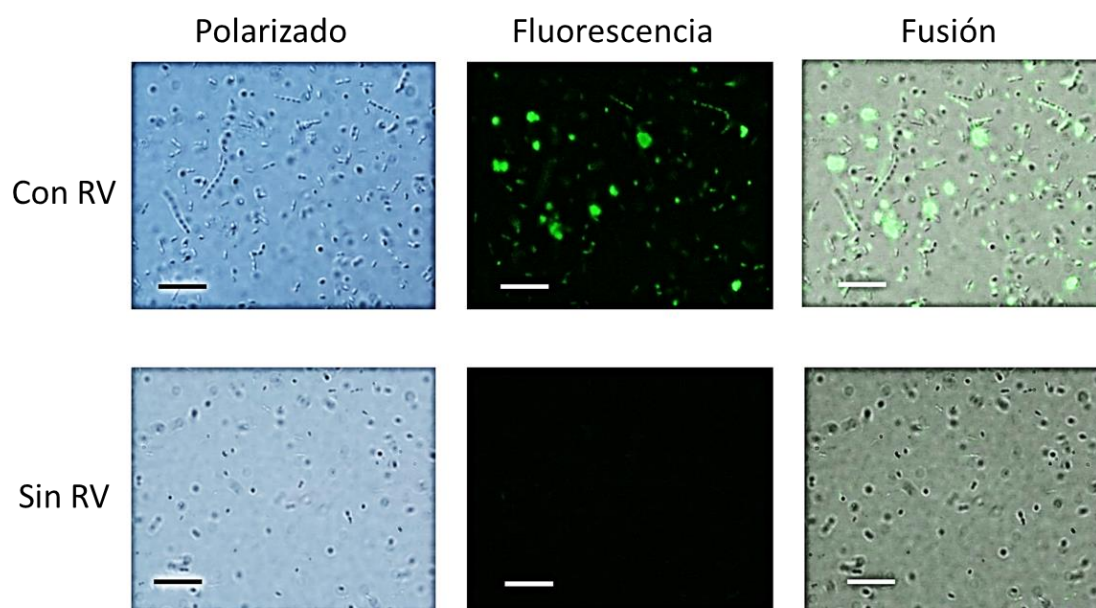


Figura 17. Interacción entre *Ruminococcus gauvreauii* y rotavirus Wa. Imágenes de microscopía que muestran la interacción entre bacterias de la especie *R. gauvreauii* y RV Wa mediante microscopía de fluorescencia. Las bacterias se incubaron con y sin RV, y se capturaron imágenes en el campo polarizado y en fluorescencia verde. También se presentan imágenes fusionadas de ambos campos. Las barras incluidas como referencia tienen un tamaño de 10 μm .

1.1.3. *Ruminococcus gauvreauii* expresa compuestos similares a los antígenos del grupo histosanguíneo en su superficie

Se desarrolló un ensayo ELISA para determinar si *R. gauvreauii*, que une RV, expresa compuestos similares a HBGAs en su superficie, lo que podría proporcionar un mecanismo de interacción física entre las bacterias y el virus. Sorprendentemente, los anticuerpos dirigidos contra los grupos sanguíneos A y B, así como contra el antígeno H y el antígeno Le^a, dieron resultados positivos para las cepas de *R. gauvreauii* probadas (DSM-19829 e IPLA-NM1), igual que el control positivo *E. cloacae* ATCC 13047 (Figura 18). No se detectó señal con el anticuerpo anti-Le^b. Se confirmó el rendimiento de este anticuerpo en un ELISA utilizando saliva de un individuo secretor positivo para Le^b, como se describe en estudios anteriores⁶⁴, lo que confirma que las bacterias no expresan moléculas similares a Le^b en su superficie. Curiosamente, los resultados del ELISA mostraron señales más intensas para algunos HBGAs en las cepas de *R. gauvreauii* en comparación con *E. cloacae*.

VIII. RESULTADOS

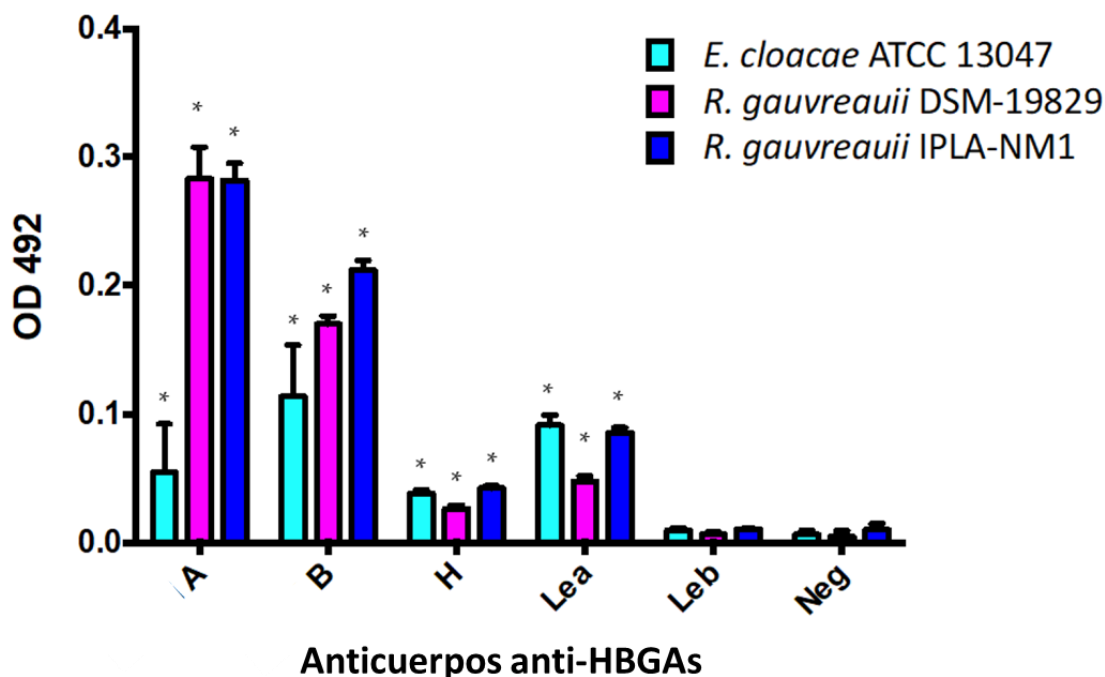


Figura 18. *Ruminococcus gauvreauii* expresa compuestos similares a los antígenos del grupo histosanguíneo en su superficie. Se muestra el resultado del ELISA (OD de 492 nm) del reconocimiento de los anticuerpos monoclonales específicos de HBGA sobre sustancias de la superficie de las dos cepas de *R. gauvreauii* y de *E. cloacae*. La imagen muestra la media de los triplicados $\pm$ SD. * Significancia estadística ($p < 0,05$, prueba t de Student) del conjunto de cepas en comparación con el control negativo (Neg).

1.1.4. *Ruminococcus gauvreauii* bloquea la infección por rotavirus Wa *in vitro*

Después de confirmar la interacción entre *R. gauvreauii* y RV Wa, se procedió a evaluar las propiedades antivirales de esta bacteria. Se llevó a cabo un ensayo de infección en el que las bacterias fueron preincubadas con monocapas celulares antes de la infección con RV, simulando así una infección natural en la que las bacterias ya están presentes en la superficie mucosal. Bajo estas condiciones, se observó que *R. gauvreauii* IPLA-NM1 se adhiere a la monocapa de células Caco-2 diferenciadas (Figura 19A) y se observó una reducción de 3 veces en la infectividad viral (medida como GCE/ml en los sobrenadantes de cultivo celular después de la infección), lo que demuestra la actividad antiviral de esta bacteria frente a RV (Figura 19B).

VIII. RESULTADOS

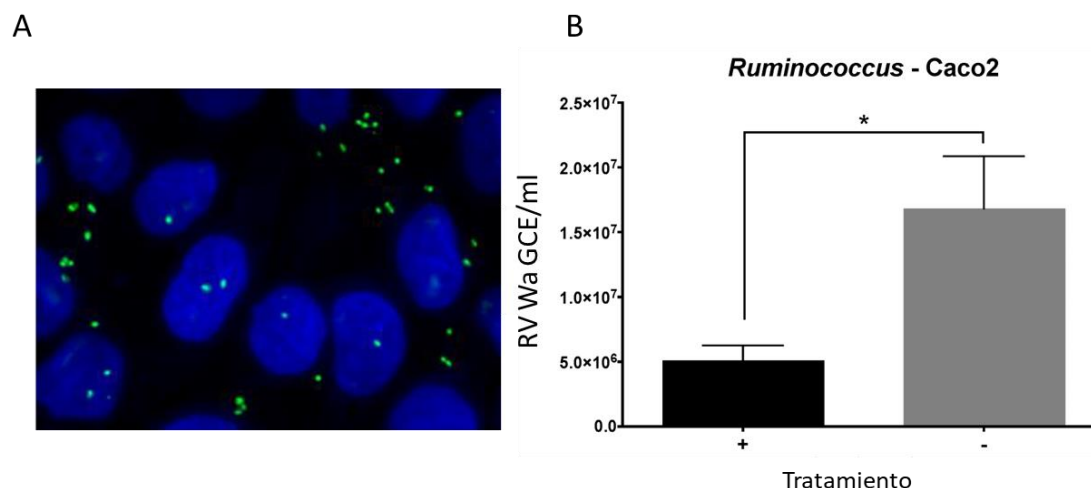


Figura 19. *Ruminococcus gauvreauii* e infectividad *in vitro* de rotavirus Wa. **A)** Células de *R. gauvreauii* IPLANM1 unidas a la monocapa de Caco-2. Las células y las bacterias fueron teñidas con DAPI. Los núcleos de Caco-2 están en azul y las células de *R. gauvreauii* están en verde. **B)** Efecto inhibitorio de la preincubación de *R. gauvreauii* en la infección por RV Wa, medido como GCE/ml en los sobrenadantes de las células Caco-2 después de la infección. Se muestra una imagen del resultado RT-qPCR, con la media de los triplicados $\pm$ SD. * Significancia estadística ($p < 0,05$, prueba t de Student) en comparación con el control negativo.

1.2. Norovirus

1.2.1. Determinación de bacterias que unen norovirus GII.4 Sydney 2012

Se analizaron muestras de heces de 9 niños diagnosticados de GEA inducida por NoV GII.4 Sydney 2012 con la intención de identificar los géneros bacterianos que interactúan con el virus en muestras directamente obtenidas de humanos.

Para ello, se llevó a cabo la separación celular mediante el empleo de partículas magnéticas y tratamientos con dos tipos de anticuerpos (control de isotipo IgG y anti-VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012), producidos y purificados tal y como se explica en el apartado 3 de Material y Métodos. Tras la aplicación de esta técnica se obtuvieron cuatro grupos de poblaciones a partir de las 9 muestras de heces: bacterias totales (T), bacterias reconocidas por el anticuerpo control de isotipo IgG (C), bacterias no reconocidas por el anticuerpo control de isotipo IgG ni por el anticuerpo específico (N) y bacterias reconocidas por el anticuerpo anti-VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 (NoV).

Se aisló y analizó el ADNr 16S de cada una de las poblaciones bacterianas y se determinó su composición microbiana a nivel de género. En los resultados del análisis LEfse, 14 taxones obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$ en test de Kruskal-Wallis, ajustado por FDR) entre los diferentes tratamientos. No obstante, dos grupos obtuvieron

VIII. RESULTADOS

la mayor puntuación LDA (Figura 20) y se identificaron con diferencias significativas en la comparación del grupo NoV con respecto al resto de grupos: *Allobaculum* spp. ($p = 0,02$, FDR = 0,6; LDA = 3,2) y *Rhodococcus* spp. ($p = 0,0003$, FDR = 0,002; LDA = 3,81).

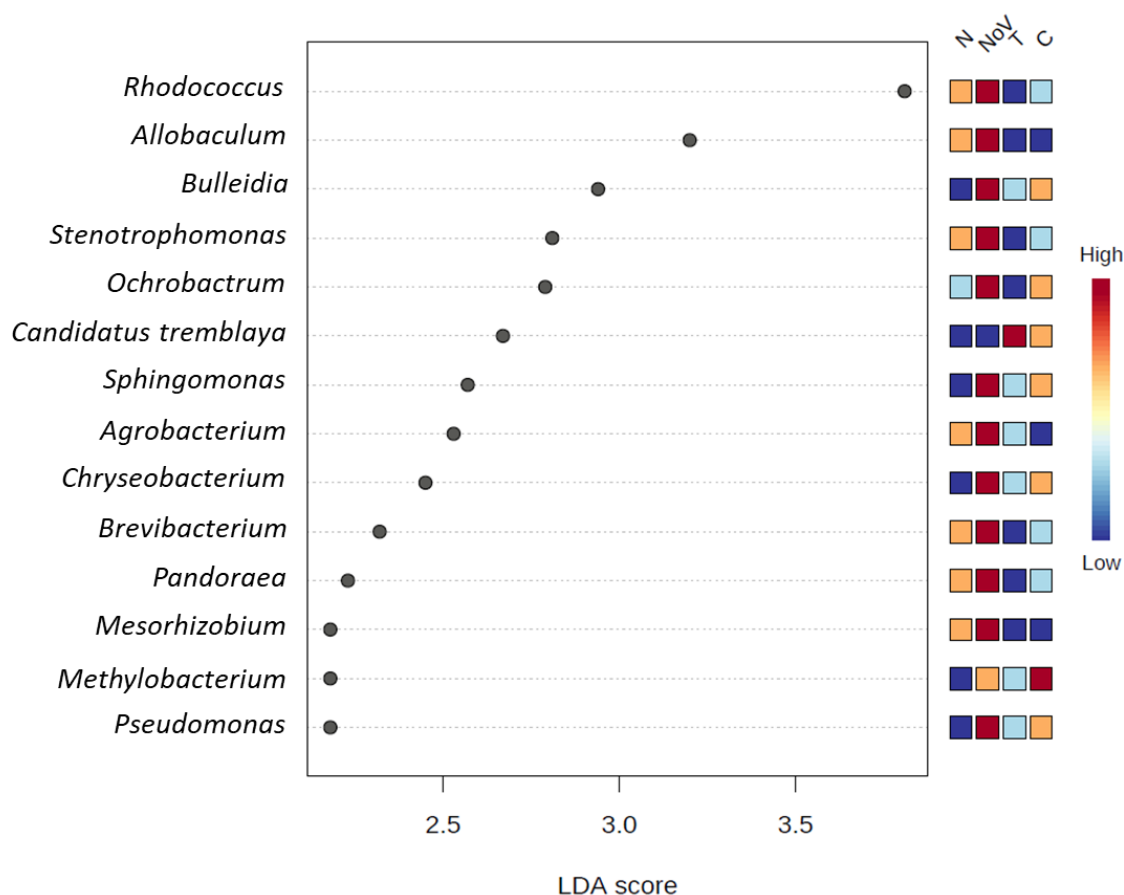


Figura 20. Análisis de discriminación lineal de géneros bacterianos aislados de muestras clínicas con norovirus. Se presenta la puntuación LDA de los 14 taxones con diferencias significativas ($p < 0,05$ en test de Kruskal-Wallis, ajustado por FDR) en el análisis LEfse. Imagen extraída de la herramienta MicrobiomeAnalyst. Se puede observar al género *Rhodococcus* con la mayor puntuación LDA. La leyenda muestra la diferencia en la intensidad de color correspondiente a la mayor o menor abundancia de los géneros en los 4 tratamientos (T: bacterias totales aisladas antes de los tratamientos; C: bacterias reconocidas por el anticuerpo control de isotipo IgG; N: bacterias no reconocidas por el anticuerpo control de isotipo ni por el anticuerpo específico; NoV: bacterias reconocidas por el anticuerpo anti-VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012).

Sin embargo, tal y como se puede observar en la Figura 21, al realizar la prueba t de Student, sólo *Rhodococcus* spp. presentó diferencias significativas entre el grupo NoV y el resto de los tratamientos ($p < 0,003$). De las 9 muestras de heces analizadas, una de ellas fue eliminada de los análisis tras ser sometido a una prueba de *outlier*, ya que la abundancia del género *Rhodococcus* en esta muestra presentó valores que diferían significativamente de la tendencia general de los datos en los 4 tratamientos. El grupo

VIII. RESULTADOS

NoV presentó una diferencia en la abundancia de 369, 88 y 28 veces la de los grupos T, C y N, respectivamente.

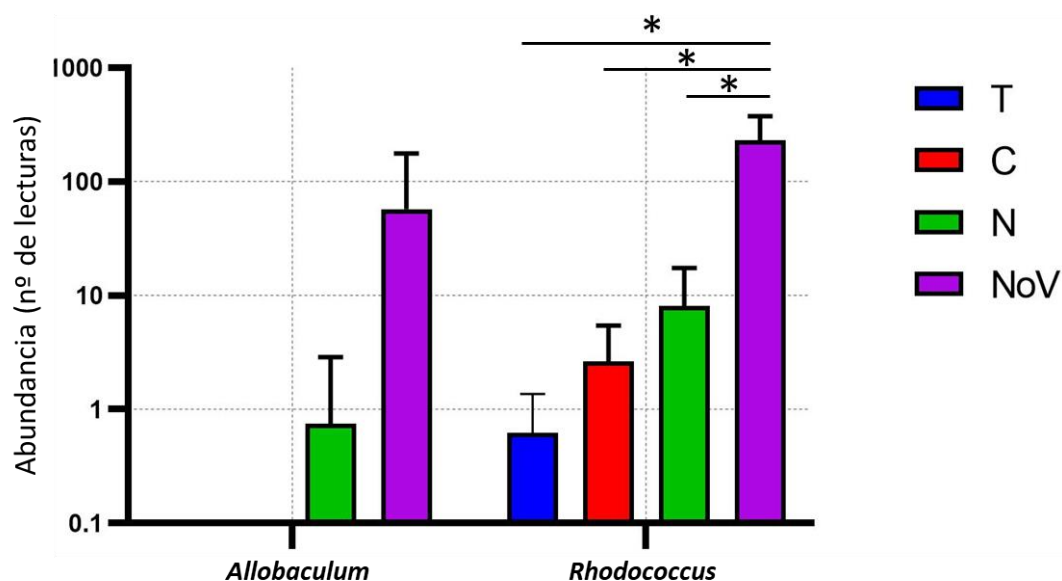


Figura 21. Bacterias que unen norovirus GII.4 Sydney 2012. Se muestra la abundancia (número de lecturas) de los géneros *Allobaculum* y *Rhodococcus* en las muestras de heces aisladas de niños con GEA por NoV GII.4 Sydney 2012. T: bacterias totales aisladas antes de los tratamientos; C: bacterias reconocidas por el anticuerpo control de isotipo IgG; N: bacterias no reconocidas por el anticuerpo control de isotipo ni por el anticuerpo específico; NoV: bacterias reconocidas por el anticuerpo anti-VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012. El resultado corresponde a la media de las réplicas $\pm$ SD. La escala del eje Y corresponde al logaritmo en base 10. * Significancia estadística ($p < 0,003$, prueba t de Student).

1.2.2. *Rhodococcus* spp. une VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012 *in vitro*

Nos sorprendió encontrar el género *Rhodococcus* en los resultados de secuenciación del ADNr 16S, ya que no se había informado previamente sobre su relación con HuNoV. Por lo tanto, adquirimos 5 especies de la CECT, pertenecientes al género *Rhodococcus* (Tabla 6, apartado 4.2 de Material y Métodos), para investigar la interacción *in vitro* entre estas cepas y las VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012. En la Figura 22A se muestra el resultado del experimento *in vitro* de unión de las VLPs con cada una de las cinco especies de *Rhodococcus* seleccionadas. Concluimos que las 5 especies tienen la capacidad de unirse a las VLPs en su superficie. En la Figura 22B se presenta una imagen de microscopía electrónica con tinción negativa después del experimento de interacción entre la especie tipo *R. rhodochrous* y las VLPs. En esta imagen se puede observar cómo las VLPs se agrupan dentro de una especie de mucosidad alrededor de la superficie de la bacteria.

VIII. RESULTADOS

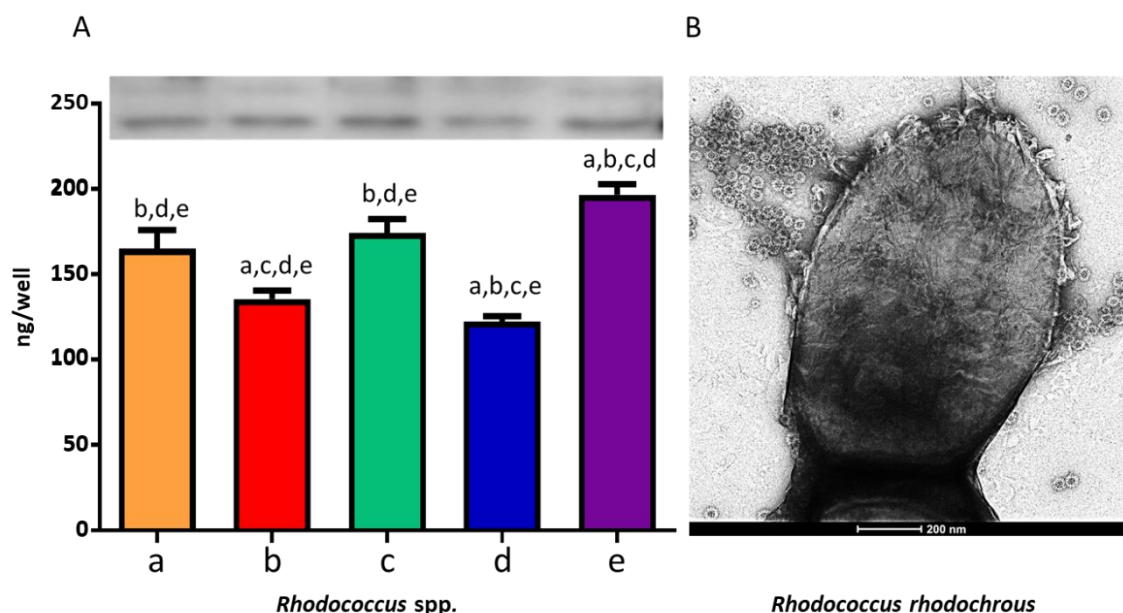


Figura 22. Interacción entre *Rhodococcus* spp. y las VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012. A) Cuantificación en ng/pocillo de VLPs adheridas a cada especie. Se muestra una imagen del resultado de Western blot, con la media de los triplicados $\pm$ SD. a. *R. corynebacterioides*. b. *R. hoagii*. c. *R. rhodochrous*. d. *R. rhodnii*. e. *R. coprophilus*. ($p < 0,05$, one-way ANOVA). B) Imagen de microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa de la adhesión entre la especie tipo *R. rhodochrous* y las VLPs (aumento a 21.000 X). La barra muestra un tamaño de 200 nm.

1.2.3. *Rhodococcus* spp. expresa compuestos similares a los antígenos del grupo histosanguíneo en su superficie

Una vez confirmada la interacción *in vitro* de las VLPs con *Rhodococcus* spp., nos propusimos averiguar si las especies seleccionadas expresan en su superficie moléculas de tipo HBGAs, pudiendo ser uno de los mecanismos de unión entre estas bacterias y NoV. La presencia de sustancias similares a HBGAs en *Rhodococcus* spp. se evaluó mediante ELISA utilizando anticuerpos monoclonales específicos frente a los diferentes HBGAs. Se encontró que todas las especies presentaron diferentes niveles de sustancias similares a HBGAs en su superficie, las cuales fueron reconocidas por varios anticuerpos anti-HBGAs (Figura 23). Todas las especies fueron reconocidas por al menos 4 de los anticuerpos ensayados, concluyendo que *Rhodococcus* spp. presenta en su superficie moléculas similares a los HBGAs de tipo A, B, H y Le^y. Además, todas las especies, excepto *R. hoagii* y *R. rhodochrous*, fueron reconocidas, aunque en menor medida, por el anticuerpo anti-Le^a y ninguna de ellas mostró interacción con los anticuerpos anti-Le^b y anti-Le^x.

VIII. RESULTADOS

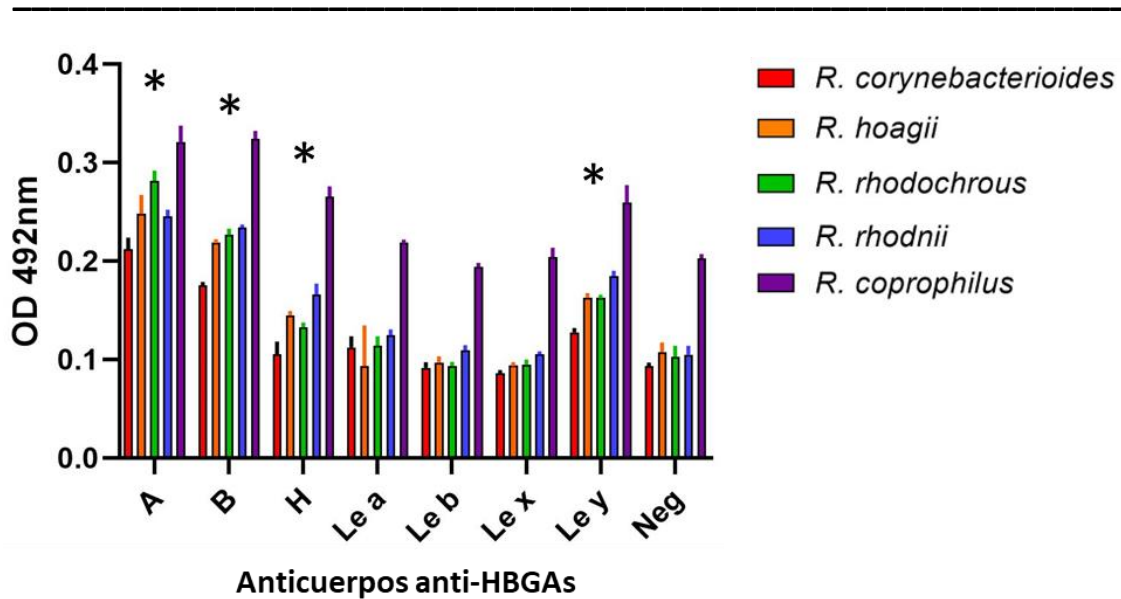


Figura 23. *Rhodococcus* spp. expresa compuestos similares a los antígenos del grupo histosanguíneo en su superficie. Se muestra el resultado del ELISA (OD de 492 nm) del reconocimiento de los anticuerpos monoclonales específicos de HBGA sobre sustancias de la superficie de las 5 cepas de *Rhodococcus* spp. La imagen muestra la media de los triplicados $\pm$ SD. * Significancia estadística ($p < 0,01$, prueba t de Student) del conjunto de cepas en comparación con el control negativo (Neg).

Estos resultados nos llevaron a investigar la interacción entre las VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 (utilizadas en el ensayo de unión con *Rhodococcus* spp.) y diferentes azúcares de los HBGA. La Figura 24 muestra los resultados del ELISA de la interacción entre las VLPs y los HBGA. Se observa que las VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 solo se unen al HBGA de tipo B y, en menor medida, a Le^x.

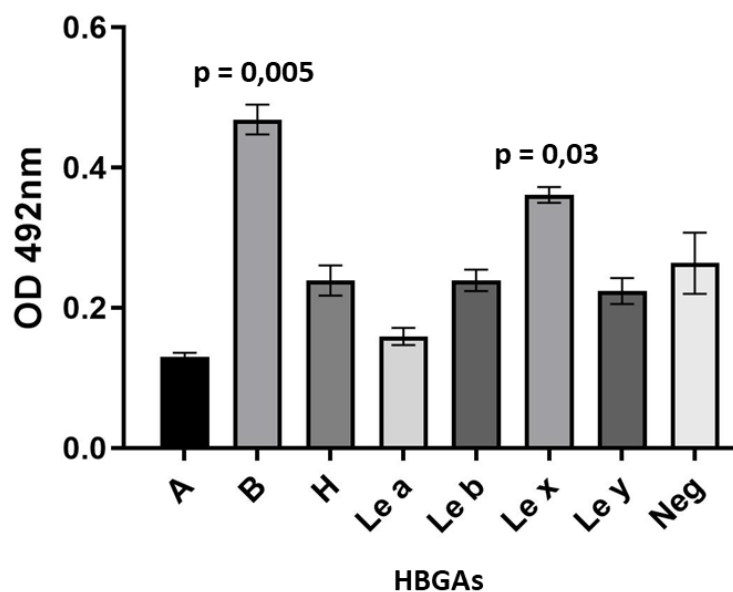


Figura 24. Interacción de las VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012 con los antígenos del grupo histosanguíneo. Se muestra el resultado del ELISA (OD de 492 nm) sobre el reconocimiento de las VLPs de distintos azúcares HBGA. La imagen muestra la media de los triplicados $\pm$ SD. Neg: control negativo de HSA. p: significancia estadística, prueba t de Student.

VIII. RESULTADOS

1.2.4. Efecto de *Rhodococcus rhodochrous* en la adhesión de norovirus *in vitro*

Al igual que con *Ruminococcus* spp. y RV, nos planteamos si el género *Rhodococcus* también pudiera ejercer algún efecto sobre la infección por parte de NoV. La ausencia de un modelo estable de infección de NoV nos hizo recurrir al uso de VLPs como alternativa ya que, por sus características estructurales, simula perfectamente la estrategia de entrada del virus nativo, hecho que nos permite estudiar la interacción del virus con la célula huésped en presencia de bacterias.

Se decidió probar el efecto a diferentes concentraciones (OD₆₀₀ 0,25, 0,5 y 1) de la cepa tipo *R. rhodochrous* (5749 CECT) sobre la adhesión de las VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 a células HT-29M6. En la Figura 25 se muestran los resultados de la cuantificación, medida como la media de valores de grises, correspondiente a la cantidad de VLPs adheridas a las células.

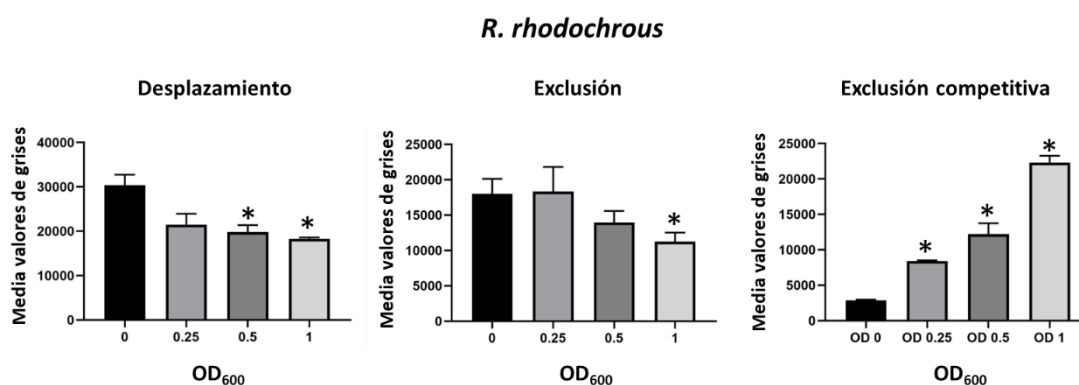


Figura 25. Efecto de *Rhodococcus rhodochrous* sobre la adhesión de VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012 a células HT-29M6. Las monocapas de HT-29M6 fueron incubadas con las VLPs y las bacterias en diferente orden y concentración (OD₆₀₀ 0,25, 0,5 y 1) y las proteínas virales fueron cuantificadas mediante Western blot. En el experimento de desplazamiento, primero se añadieron las VLPs y después las bacterias. En el de exclusión, primero se añadieron las bacterias y luego las VLPs. En el de exclusión competitiva, se añadieron las bacterias y las VLPs al mismo tiempo. Se comparó la adhesión con respecto al control correspondiente al 100 % de unión de VLPs a las células HT-29M6 (OD₆₀₀ de 0, VLPs sin bacterias). Las barras representan la media de los triplicados $\pm$ SD. * Significancia estadística ($p < 0,05$, prueba t de Student) de la comparación con el control.

Se observaron distintos efectos para cada tipo de experimento. Cuando se realizó el experimento de desplazamiento, donde primero se incubaron las VLPs con las células y luego se incorporaron las bacterias, se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control (VLPs sin bacterias) a una OD₆₀₀ de 0,5 y 1. La incorporación de *R. rhodochrous* produjo el desplazamiento de las VLPs de las células (OD₆₀₀ 1, disminución del 40 %). Lo mismo ocurrió en el experimento de exclusión, en el que primero se

VIII. RESULTADOS

incubaron las bacterias con las células y luego se incorporaron las VLPs. A una OD₆₀₀ de 1, al incubar las células con *R. rhodochrous*, la adhesión disminuyó en un 37 %, por lo que la presencia previa de bacterias en la monocapa celular evitó la unión de las VLPs sobre las células. El efecto más acusado se dio en el experimento de exclusión competitiva, en el cual se añadieron a las células la mezcla de VLPs y bacterias. En este caso, la presencia de bacterias aumentó en un 674 % la adhesión de las VLPs a las células (OD₆₀₀ 1).

2. Estudio del papel de la microbiota en la infección por rotavirus y norovirus humanos en un modelo murino

Con el propósito de profundizar en el conocimiento sobre el impacto de la microbiota en la susceptibilidad a la infección por HRV y HuNoV, decidimos emplear el modelo de ratón C57BL/6J. Dada la dificultad para replicar virus humanos en el modelo de ratón, hipotetizamos que el trasplante con microbiota humana podría favorecer la infección con estos virus. Para ello, se diseñó un experimento en el que se incluyeron cuatro grupos de ratones (n=5): grupo Control, al que no se le realizó ningún tratamiento; grupo self-FMT, al que se le realizó un autotrasplante de microbiota; grupo hFMT, que recibió un trasplante de microbiota humana de lactantes; y grupo Ab, el cual fue tratado con antibióticos durante todo el experimento (Figura 15 del apartado 5.2 de Material y Métodos).

Tras tratar a los ratones con una combinación de antibióticos en el agua de bebida durante tres semanas, pudimos observar que el tratamiento fue efectivo ya que el recuento de bacterias cultivables en las heces de los grupos tratados con antibióticos (Ab, self-FMT y hFMT) disminuyó de $6,3 \times 10^{10}$ - $9,7 \times 10^{10}$ UFC/g (antes de incorporar los antibióticos) a niveles no detectables al finalizar las 3 semanas de tratamiento, mientras que se mantuvo estable en el grupo control ($4,9 \times 10^{10}$ UFC/g).

En primer lugar, se detallarán los resultados obtenidos del experimento de infección con RV Wa y, en segundo lugar, los obtenidos con la infección con NoV GII.4 Sydney 2012 [P16].

VIII. RESULTADOS

2.1. Rotavirus

2.1.1. Impacto de los tratamientos en la configuración de la comunidad bacteriana

Primero se evaluó si con los distintos tratamientos se consiguió modificar el perfil de la microbiota murina. La composición de la microbiota en las heces se determinó justo antes de la infección con RV mediante secuenciación del ADNr 16S.

La diversidad beta es un análisis que permite cuantificar la similitud o diferencia en la composición bacteriana entre diferentes muestras. Los resultados se pueden visualizar en el gráfico PCoA (Figura 26). Efectivamente, atendiendo a la diversidad beta, se puede observar que el perfil de microbiota de los cuatro grupos de ratones se separó a lo largo de los dos ejes. Este resultado confirma que los tratamientos tuvieron un fuerte efecto en la composición de la microbiota fecal, lo que fue confirmado por el análisis estadístico (valor F de PERMANOVA = 36,77; $R^2 = 0,88$; $p < 0,001$). En esta gráfica se puede ver cómo los grupos Control y self-FMT están más cercanos entre sí que entre el resto de los grupos, lo que muestra una mayor similitud en la composición bacteriana, quedando muy distante del grupo hFMT. Además, podemos observar que el perfil de microbiota de los ratones hFMT es más similar a la compuesta por el grupo donante (microbiota humana de lactantes sanos).

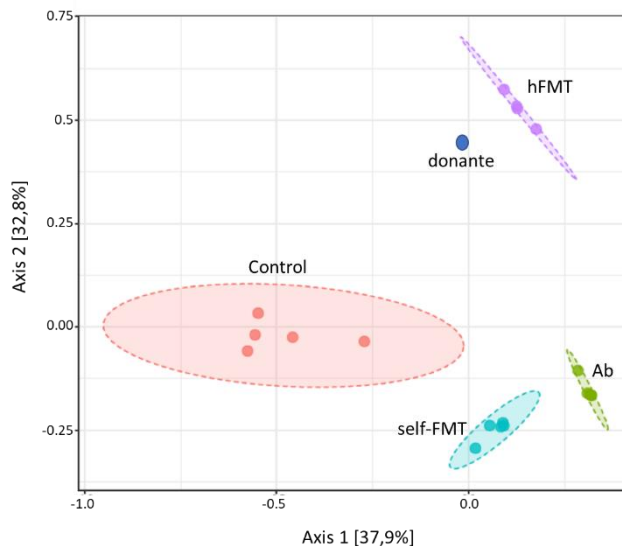


Figura 26. Diversidad beta a nivel de OTU en ratones infectados con rotavirus Wa. Se muestra la gráfica PCoA de los distintos grupos de ratones, medida mediante los índices de disimilitud de Bray-Curtis. Control: grupo sin tratamiento; Ab: grupo tratado con antibióticos durante todo el experimento; self-FMT: grupo con autotrasplante de microbiota; hFMT: grupo con trasplante de microbiota humana; donante: microbiota de heces humanas recibidas por el grupo hFMT.

VIII. RESULTADOS

Al analizar la composición general de cada uno de los grupos, como era de esperar, los tres tratamientos distintos causaron una profunda remodelación del perfil microbiano intestinal y todos los grupos pudieron diferenciarse en términos de composición microbiana.

La Figura 27 muestra el porcentaje de la abundancia de taxones con respecto al total de taxones detectados en cada grupo de ratones (abundancia relativa). En general, podemos ver cómo cambia la composición microbiana tras los distintos tratamientos en comparación al grupo Control. En todos los grupos aparece en mayor o menor proporción miembros del filo *Bacillota*, antiguo filo *Firmicutes* (Figura 27A), siendo superior en el Control (80 %). Curiosamente, la abundancia del filo *Pseudomonadata* (al que pertenecen las enterobacterias) se ve aumentada tras los distintos tratamientos (Figura 27A), siendo mayor en los dos grupos donde más virus se ha detectado tras la infección (32 % en Ab y 40 % en hFMT). De la misma manera, la abundancia del género *Lactococcus* (Figura 27C) también ha resultado aumentada tras los tratamientos, siendo la mayor representante en la composición microbiana del grupo Ab (68 %).

La microbiota presente en las heces infantiles (donantes) no se injertó completamente en los ratones después del hFMT. De nuevo, se puede apreciar cómo los miembros del género *Lactococcus* (Figura 27C) y las enterobacterias (Figura 27B) están presentes de manera elevada en el grupo hFMT (20 % y 40 %, respectivamente) con respecto al grupo donante (0,005 % y 7 %, respectivamente), lo que significa que estos taxones se implantaron mejor en el huésped murino. Destaca también la presencia, aunque en baja proporción, de miembros del género *Megasphaera* (0,5 %) en el grupo hFMT, un taxón bacteriano que estaba ausente en la microbiota de los ratones Control y supone el 25 % de la microbiota donante (Figura 27C). Además, los ratones del grupo hFMT también se caracterizaron por un elevado número de bacterias del filo *Bacteroidota* (40 %).

VIII. RESULTADOS

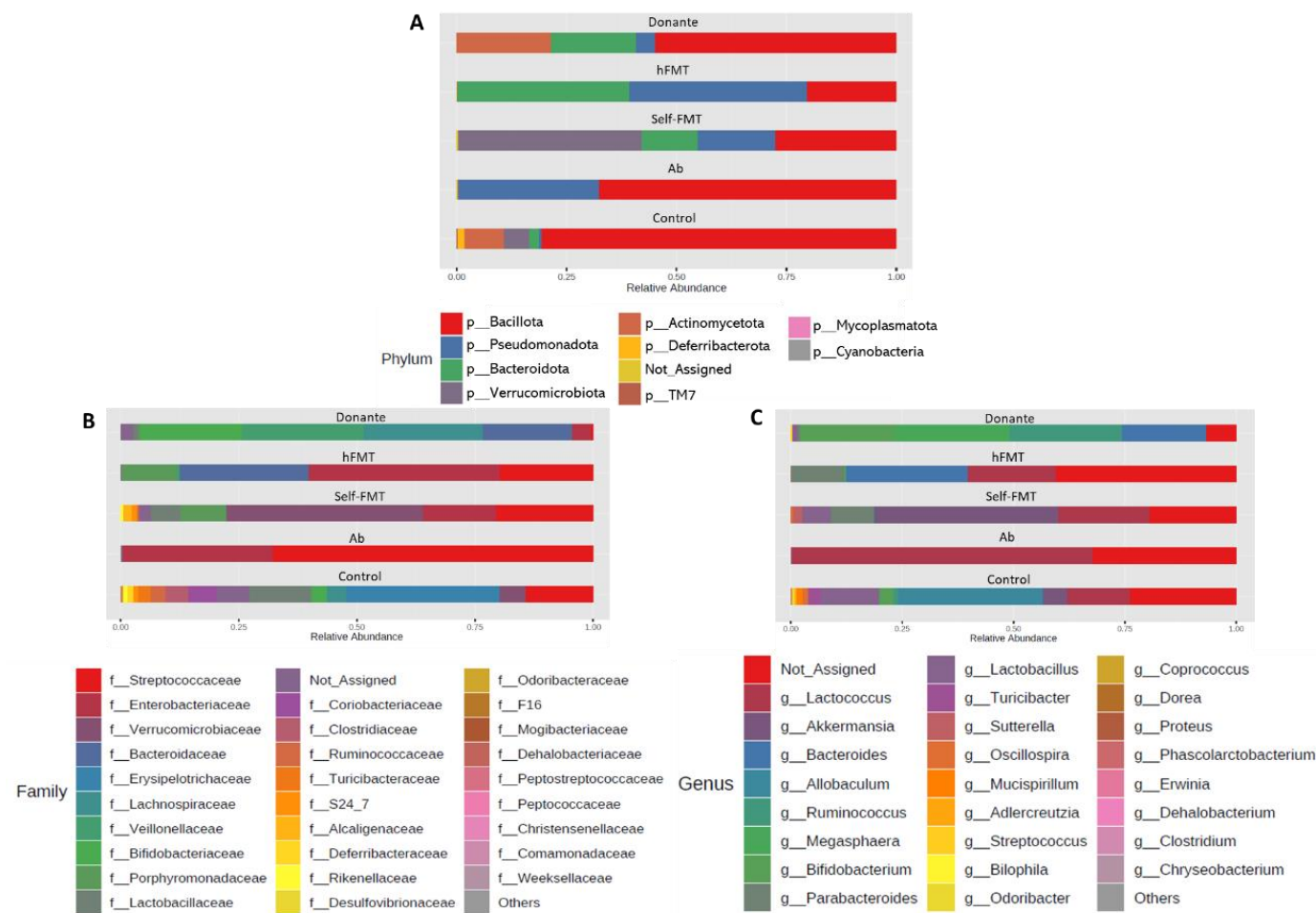


Figura 27. Distribución de taxones bacterianos en los grupos de ratones infectados con rotavirus Wa. Se muestra la abundancia relativa (en porcentaje) de taxones bacterianos en los ratones infectados con RV Wa (G1P[8]) a nivel de filo (A), familia (B) y género (C). La secuenciación del ADNr 16S fue realizada antes de la infección viral. Donante: microbiota humana utilizada para el trasplante del grupo hFMT; hFMT: ratones con trasplante de microbiota humana; self-FMT: ratones con trasplante de microbiota murina; Ab: ratones tratados con antibiótico durante el experimento; Control: grupo sin tratamiento.

VIII. RESULTADOS

2.1.2. Cuantificación de la carga viral tras la infección por rotavirus

Tras la realización de los trasplantes (self-FMT y hFMT), todos los grupos fueron infectados con $1,6 \times 10^{10}$ GCE de RV Wa por vía oral. Hay que mencionar que dos de los ratones fallecieron durante la última semana previa a la infección, por lo que al final el grupo Control y hFMT lo conformaron 4 ratones en lugar de 5 (Figura 28B).

Tal y como puede observarse en la Figura 28A, los grupos Control y self-FMT alcanzaron su pico de liberación viral a las 24 horas de la infección (dpi 1), con un nivel de excreción de 1×10^{10} GCE/g de heces, y fue indetectable en el dpi 4. Sin embargo, si visualizamos la Figura 26B, podemos asociar la liberación de virus en el dpi 2 y 3 a ratones individuales de estos grupos. En contraste, los ratones tratados con antibióticos (Ab) y los ratones con hFMT mostraron una eliminación viral en el dpi 1 aproximadamente de 21 y 15 veces mayor a los ratones control y self-FMT ($2,1 \times 10^{11}$ GCE/g y $1,5 \times 10^{11}$ GCE/g, respectivamente). Además, la eliminación en estos dos grupos se mantuvo hasta el dpi 5-6 siguiendo un patrón evolutivo similar, con valores superiores a 10^9 GCE/g hasta el dpi 5. No hubo diferencias significativas en las medias de excreción viral entre los grupos Ab y hFMT y entre los grupos control y self-FMT a lo largo de los 6 días tras la infección.

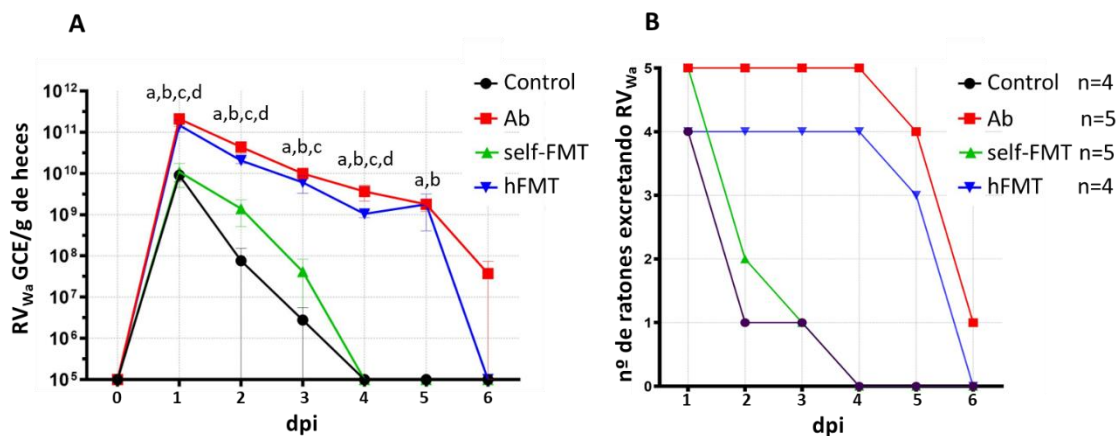


Figura 28. Excreción de rotavirus Wa en las heces de ratones. A) Se muestra el nivel de excreción viral (GCE/g de heces) para los ratones Control, los ratones tratados con antibióticos (Ab), los ratones sometidos a autotrasplante de microbiota fecal (self-FMT) y microbiota humana (hFMT). Los ratones fueron seguidos durante 6 días y sacrificados el día 7. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, prueba t de Student) en los GCE/g entre los grupos: a. Ab vs. Control; b. Ab vs. self-FMT; c. hFMT vs. Control; d. hFMT vs. self-FMT; e. Ab vs. hFMT; f. Control vs. self-FMT). Se muestra la media de los replicados $\pm$ SEM. El límite de detección fue de 10^5 GCE/g de heces. **B)** Se muestra el número total de ratones que excretan rotavirus en cada dpi, con el número inicial de ratones con excreción de virus (n). Ab, antibiótico; self-FMT, autotrasplante de microbiota fecal; hFMT, trasplante de microbiota fecal humana.

VIII. RESULTADOS

En conclusión, los niveles más bajos de RV detectados en los grupos Control y self-FMT (mismo nivel que del inóculo), así como su rápida eliminación, indican ausencia de replicación, mientras que en los grupos Ab y hFMT se observa un mayor nivel de excreción viral (un orden superior a la cantidad inoculada) y una eliminación más prolongada.

2.1.3. Efecto de la abundancia y de la diversidad sobre la infección

Los resultados de la eliminación viral sugieren que los cambios en la microbiota causados por el tratamiento con antibióticos (grupo Ab) y el trasplante humano (grupo hFMT) fueron responsables de la susceptibilidad a la infección por RV Wa en los ratones.

Cuando evaluamos mediante qPCR la cantidad de bacterias totales previa a la infección, los resultados mostraron que el tratamiento con antibióticos redujo significativamente el número de bacterias respecto al grupo Control (92 %, IC 95 % 13 % - 171 %), calculado mediante qPCR del ADNr 16S (Figura 29). Los grupos self-FMT y hFMT aumentaron el número de bacterias posteriormente al trasplante, sin diferencias significativas entre ellos ni respecto al Control. Cuando se realizó el análisis de correlación entre la cantidad de bacterias y el título viral, se obtuvo una correlación ligeramente significativa ($p = 0,06$), con un valor de $r = -0,37$.

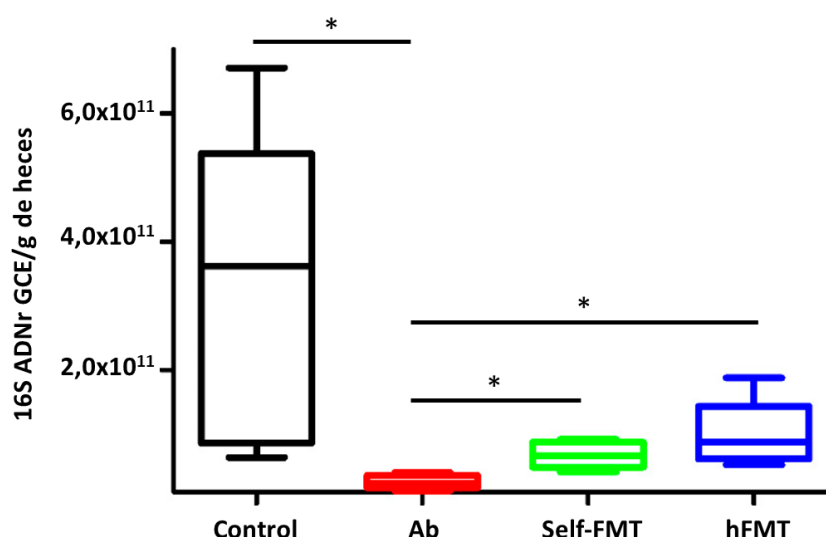


Figura 29. Cuantificación de bacterias totales en las heces de ratones previa a la infección con rotavirus Wa. La cuantificación se realizó mediante qPCR del ADNr 16S. Se presenta la media de los GCE/g de heces ($\pm$ los valores mínimo y máximo) para los distintos grupos de ratones: ratones sin tratamiento (Control), ratones tratados con antibióticos (Ab), ratones sometidos a autotrasplante de microbiota fecal (self-FMT) y ratones con trasplante de microbiota fecal humana (hFMT). *Significancia estadística ($p < 0,05$, prueba t de Student).

VIII. RESULTADOS

Por otro lado, mediante el análisis de diversidad alfa podemos evaluar la riqueza y la uniformidad en la distribución microbiana en cada una de las muestra, independientemente del número total de bacterias presentes.

El índice de Chao1 hace referencia a la riqueza dentro de una muestra y estima el número total de taxones presentes en cada tratamiento, teniendo en cuenta tanto los observados como los no observados. Este índice tiene en cuenta la abundancia relativa de cada taxon y utiliza información sobre los menos frecuentes para hacer una estimación del número total de asignaciones diferentes. Por otro lado, mediante el índice de Shannon se estima tanto el grado de riqueza como de equidad, es decir, la uniformidad de la distribución de las especies en la muestra. En resumen, mediante el índice de Chao1 podemos saber cuántos taxones diferentes hay mientras que el índice de Shannon nos permite saber si la diversidad hallada en cada tratamiento es además uniforme, es decir, muchos taxones diferentes distribuidos en proporciones homogéneas.

En la Figura 30 podemos observar que la diversidad alfa se vio severamente afectada después de los diferentes tratamientos. El índice de Chao1 (Figura 30A) fue más bajo en todos los grupos en comparación con el Control ($p = 2,03 \times 10^{-12}$; valor $F = 206,49$, ANOVA), lo que indica pérdida de riqueza bacteriana tras los tratamientos. La abundancia resultó más elevada en los animales self-FMT que en los grupos Ab y hFMT. Sin embargo, al observar el índice de Shannon (Figura 30B), aunque también fue más bajo en todos los grupos respecto al control ($p = 1,89 \times 10^{-8}$; valor $F = 57,29$, ANOVA), fue más elevado en el grupo hFMT en comparación a los otros tratamientos, lo que indica una distribución más uniforme de la composición microbiana en este grupo.

En ambos tipos de análisis, los extremos de mayor y menor diversidad correspondieron al grupo Control y Ab, respectivamente.

VIII. RESULTADOS

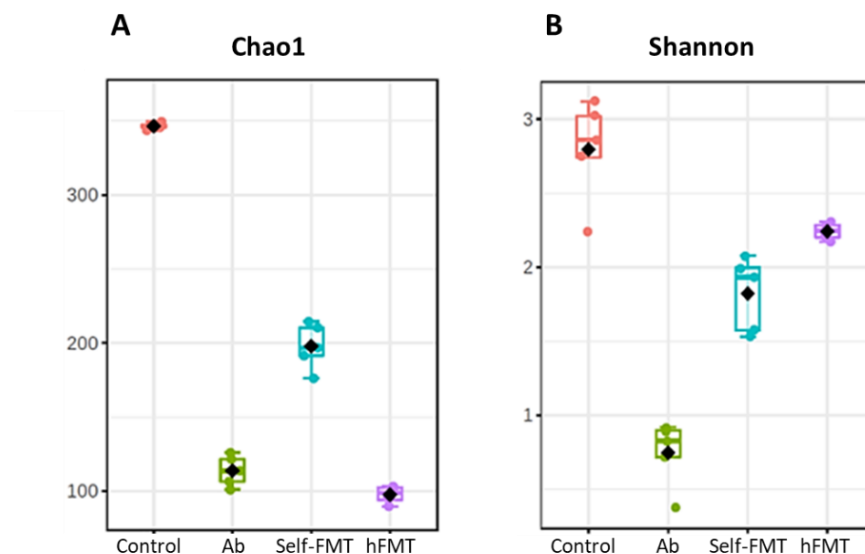


Figura 30. Diversidad alfa a nivel de OTU en ratones infectados con rotavirus Wa. Se muestran los índices Chao1 (A) y Shannon (B) para el conjunto de datos analizado. Control: grupo sin tratamiento; Ab: grupo tratado con antibióticos durante todo el experimento; self-FMT: grupo con autotrasplante de microbiota; hFMT: grupo con trasplante de microbiota humana.

2.1.4. Marcadores bacterianos relacionados con la replicación de rotavirus

Tras revisar las diferencias generales del perfil de microbiota de cada grupo, nos propusimos analizar los biomarcadores bacterianos que contribuyen significativamente a la infección por RV Wa.

En el análisis LEfse, 24 taxones bacterianos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de ratones ($p < 0,05$ en test de Kruskal-Wallis, ajustado por FDR), con puntuaciones LDA superiores a 2,5 (Figura 31).

A continuación, se muestran las gráficas del número de lecturas de cada género, normalizado por TSS y transformados logarítmicamente, de forma que están expresados en log-ratio.

VIII. RESULTADOS

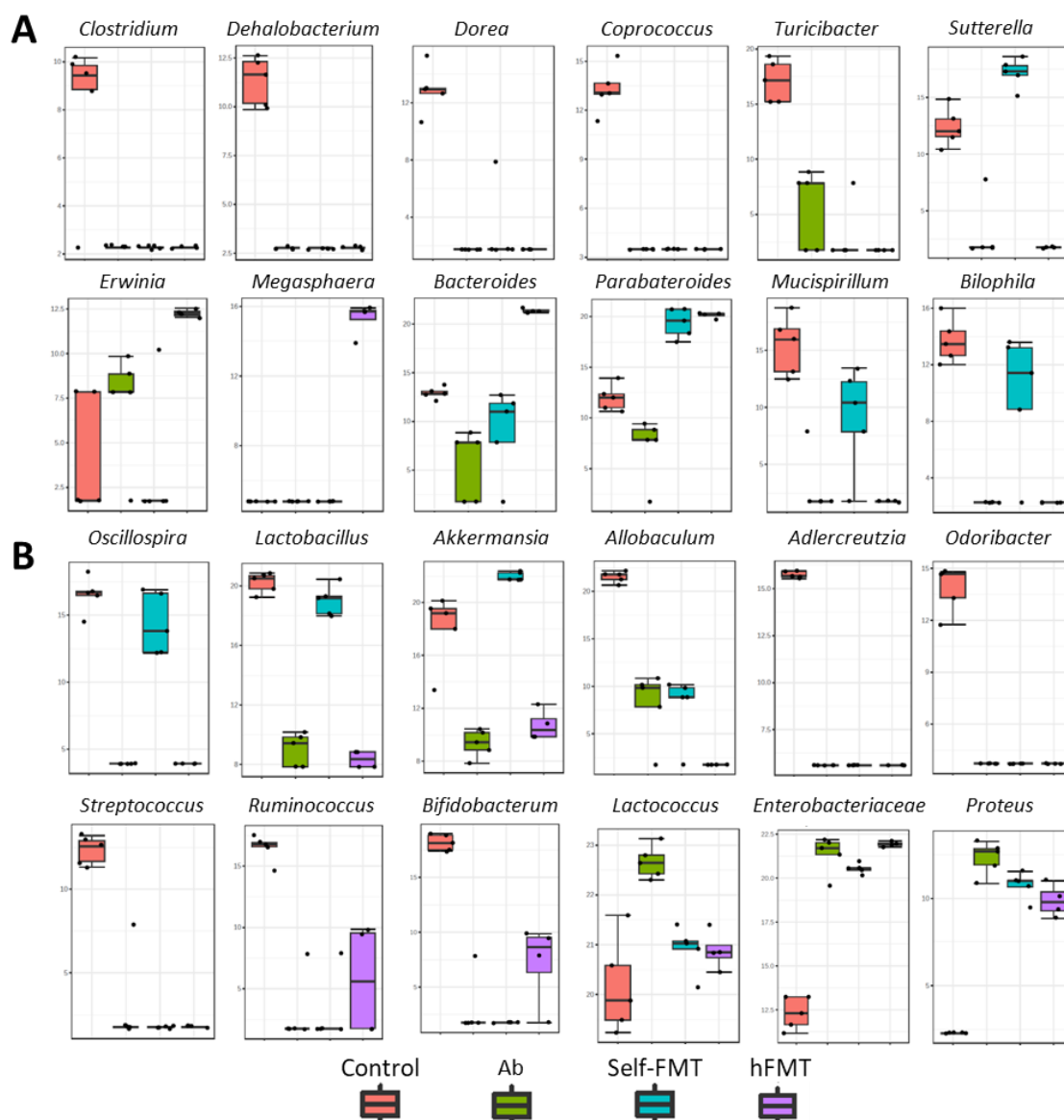


Figura 31. Biomarcadores bacterianos (LEFse) con diferencias entre los grupos de ratones infectados con rotavirus Wa. Los diferentes diagramas de caja representan el número de lecturas de cada género, a excepción de las enterobacterias, normalizado por TSS (datos en escala logarítmica en base 2). Se muestran los géneros con puntuación LDA > 2,5. **A)** Taxones sin correlación con el título viral; **B)** Taxones con correlación con el título viral. Rojo, ratones Control; verde, ratones tratados con antibióticos (Ab); azul, ratones self-FMT; magenta, ratones hFMT.

En primer lugar, se describen aquellos géneros cuya presencia no correlacionó con los niveles de excreción viral, por lo que las diferencias son debidas a los distintos tratamientos (Figura 31A).

Los géneros *Clostridium*, *Dehalobacterium*, *Dorea*, *Coprococcus* y *Turicibacter* se vieron afectados por la administración de antibióticos ya que se encontraban en bajos porcentajes en la composición del grupo Control (entre 0,01 % y 2,58 %,

VIII. RESULTADOS

respectivamente) y fueron anulados en los tres grupos tratados. Por otro lado, los taxones *Sutterella*, *Erwinia*, *Megasphaera*, *Bacteroides* y *Parabacteroides* tuvieron una influencia clara del trasplante de microbiota. Diversos géneros provenientes de la microbiota humana se implantaron favorablemente en la microbiota del ratón. Por un lado, los géneros *Erwinia* y *Megasphaera* se hallaron exclusivamente en la microbiota donante (Figura 27C) y constituyen el 0,05 % y 0,47 % de la microbiota del grupo receptor (hFMT), respectivamente. En el caso del género *Bacteroides*, la mayoría de las bacterias de este género presentes en el grupo hFMT (27,35 %) provienen también de la microbiota humana, pues sólo constituyen el 0,08 % de la microbiota original de los ratones (grupo Control), disminuyendo a 0,02 % tras el autotrasplante y anulándose en el grupo Ab. También se puede observar que el género *Parabacteroides* se restauró tras el trasplante de microbiota en ambos grupos por igual (9,66 % en self-FMT y 11,76 % en hFMT). Por último, los géneros *Mucispirillum* y *Bilophila* sólo se encontraron presentes y en bajas proporciones en el grupo Control (1,3 % y 0,3 %, respectivamente) y en el grupo self-FMT (0,03 % y 0,05 %, respectivamente).

La Figura 31B muestra los taxones cuya abundancia correlacionó positiva o negativamente con el título viral (GCE/g de heces). Es importante mencionar que se incluyeron en este apartado a los géneros cuyo resultado de correlación mostraron cierta tendencia, pero dieron valores de significancia ligeramente superiores a 0,05 (Figura 32).

Por tanto, para establecer una relación de influencia sobre la infección debida a la presencia de determinados géneros bacterianos, se extrajeron los datos del número de lecturas de cada uno de los 24 taxones (datos rarefaccionados al mínimo de la librería) para cada animal y se hizo un análisis de correlación de Pearson respecto al título viral de cada uno de los ratones a las 48h de la infección (Figura 32).

VIII. RESULTADOS

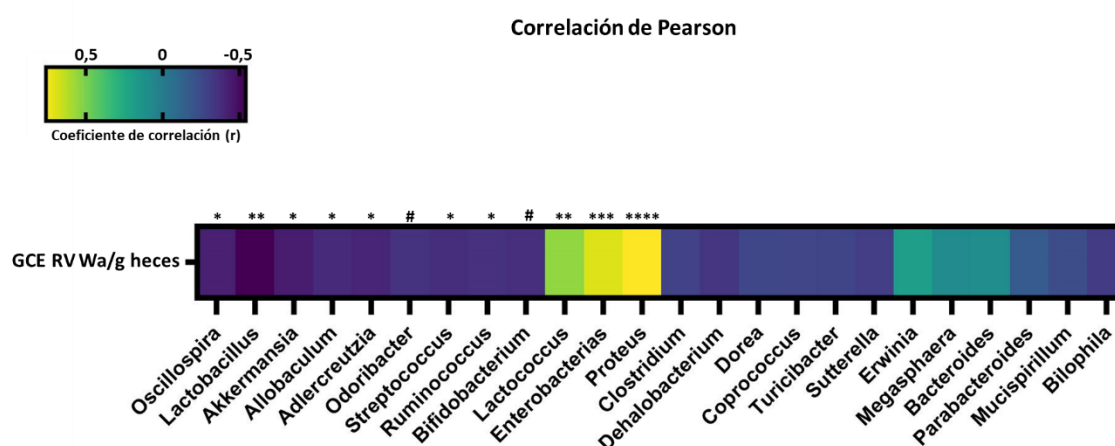


Figura 32. Mapa de calor de la matriz de correlación de Pearson entre el nivel de excreción viral de rotavirus Wa y la abundancia de los taxones bacterianos. Se incluye el valor de correlación (r) según el color y el valor de significancia: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001; #p < 0,06.

En primer lugar, los géneros *Oscillospira*, *Lactobacillus*, *Akkermansia*, *Allobaculum*, *Adlercreutzia*, *Odoribacter*, *Streptococcus*, *Ruminococcus* y *Bifidobacterium* correlacionaron negativamente y de forma moderada con el título viral, por lo que podrían contribuir a la restricción de la replicación por RV G1P[8].

En segundo lugar, tal y como se puede observar, *Proteus* spp., *Lactococcus* spp. y las enterobacterias correlacionaron positivamente con la excreción viral. *Lactococcus* spp. y las enterobacterias lo hicieron moderadamente mientras que la influencia del género *Proteus* sobre la carga viral correlacionó con mayor nivel de significancia (p < 0,0001). En la Figura 30B y 30C se puede apreciar que el género *Lactococcus* y las enterobacterias representaron la microbiota mayoritaria de los grupos donde más excreción hubo (67,7 % y 31,87 % del grupo Ab; 19,76 % y 40,41 % del grupo hFMT, respectivamente) mientras que su abundancia fue menor en los grupos Control (14,18 % y 0,07 %) y self-FMT (20,53 % y 15,56 %). Aunque la presencia del género *Proteus* con respecto al resto de géneros fue mínima (0,07 % en Ab, 0,02 % en self-FMT, 0,01 % en hFMT y ausente en Control), fue el género con mayor fuerza de correlación respecto al título viral (r = 0,6). Por tanto, los datos resultantes sugieren que estos tres grupos podrían ser considerados grupos permisivos de la infección por RV Wa en este modelo.

VIII. RESULTADOS

2.1.5. Efecto de los tratamientos y de la infección por rotavirus sobre la expresión de biomarcadores inmunológicos y del gen *Fut2*

Tras analizar la diferencia en los niveles de liberación viral, así como el perfil de la microbiota en cada uno de los grupos de ratones, nos propusimos evaluar el nivel de expresión génica de un conjunto de marcadores proinflamatorios (IL1 β , IL6, CXCL15 (IL8), IL12, TNF α , IFN γ), antiinflamatorios (IL4, IL10 Y IL13) y del receptor TRL2. También se analizó la expresión del gen *Fut2*, cuyo producto está involucrado en la fucosilación durante la síntesis del antígeno H. Es sabido que este antígeno es uno de los receptores de adhesina de RV del genotipo P[8]⁴⁹. Para ello, se cuantificó mediante RT-qPCR la expresión génica en el intestino delgado de los ratones a los 7 días de la infección.

En la Figura 33A se presentan los resultados de expresión (extraídos de la herramienta REST) usando como referencia el grupo de ratones Control. Además, se describen aquellos marcadores inmunológicos influenciados por el trasplante de microbiota utilizando como referencia el grupo Ab. Este grupo recibió el mismo tratamiento de antibióticos que los grupos self-FMT y hFMT pero sin recibir trasplante. Por último, en la Figura 33B se muestra el análisis de correlación entre el nivel de expresión (diferencia de la media de Ct de cada marcador respecto al gen de referencia) y el título viral (GCE/g) a las 48 h con el objetivo de examinar aquellos marcadores relacionados con la infección.

Recordemos que el tratamiento con antibióticos influyó sobre la diversidad alfa ya que, en todos los grupos tratados con antibióticos (incluidos los grupos con trasplante), la riqueza y uniformidad microbiana se vio significativamente reducida con respecto al grupo Control (Figura 29). Por tanto, tal y como se puede observar en la Figura 33A, la administración de antibióticos provocó diferencias significativas en la expresión de *Il10*, *Tnf α* y *Tlr2* en todos los grupos tratados. *Il10* se redujo en un 27 %, 26 % y 28 % en los grupos Ab, hFMT y self-FMT respectivamente, mientras que la expresión de *Tnf α* y *Tlr2* resultó fuertemente reducida (69 % y 48 % en Ab; 70 % y 56 % en hFMT; 74 % y 51 % en self-FMT, respectivamente). Por otro lado, el análisis de correlación entre la expresión génica de estos moduladores respecto a los niveles de liberación viral indica que la menor expresión de *Il10*, *Tnf α* y *Tlr2* se correlacionó significativamente y de forma moderada con un mayor nivel de liberación viral (Figura 33B). En cuanto a los niveles de

VIII. RESULTADOS

expresión de *Il1β* y *Cxcl15* (*Il8*), éstos fueron más bajos en los grupos tratados con Ab y hFMT, donde RV replicó de manera más eficiente. En este caso, *Il1β* también se correlacionó fuertemente con un mayor nivel de liberación viral, mientras que los menores niveles de *Cxcl15* se correlacionó moderadamente (Figura 33B). Tal y como se puede observar en la Figura 33A, los niveles de expresión de *Il4*, *Il6*, *Il12* y *Il13* no difirieron significativamente entre los grupos experimentales y los animales Control.

Cuando evaluamos el efecto del trasplante sobre la expresión de los mediadores inmunológicos (grupo Ab como referencia), la expresión de *Il6*, *Il12* y *Tlr2* se vio reducida en el grupo que recibió el trasplante de microbiota humana (29 %, 36 %, y 16 %, respectivamente) mientras que *Il13* aumentó su expresión en un 37 % con respecto al grupo Ab. No se vieron diferencias significativas en la expresión de estas citocinas en el grupo self-FMT. Finalmente, la expresión de *Ifnγ* estuvo relacionada con el trasplante de microbiota, pues disminuyó en los ratones sometidos a ambos tratamientos de FMT (32 % en self-FMT y 25 % en hFMT).

Al comparar el tipo de microbiota entre los grupos self-FMT y hFMT, se reafirmó el efecto de la microbiota humana sobre la expresión génica de las citocinas IL12 e IL13 y el receptor TLR2, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,02$). Curiosamente, *Cxcl15* también mostró diferencias significativas en el grupo hFMT, con una reducción en su expresión del 24 % respecto al grupo self-FMT ($p = 0,01$).

Por último, cuando observamos el resultado utilizando como referencia el grupo Control, la expresión del gen *Fut2* se encontró regulada a la baja en los animales self-FMT (54 %, $p = 0,01$) y moderadamente reducida en el grupo Ab (34 %, $p = 0,08$), lo que sugiere que se deba a la pérdida de taxones que inducen la expresión de este gen en el intestino. Curiosamente, al comparar la expresión con respecto al tipo de microbiota (grupo Ab como referencia), se puede observar que la expresión de *Fut2* difirió entre ambos grupos de trasplante, mostrando mayores niveles en el grupo que recibió el trasplante de heces humanas (1,4 veces más que Ab, $p = 0,03$; y 1,9 veces más que self-FMT, $p = 0,003$). Este hecho cobra sentido ya que la riqueza y diversidad microbiana del grupo hFMT fue mayor en comparación a los otros dos grupos tratados, lo que sugiere,

VIII. RESULTADOS

de nuevo, que la presencia de determinados taxones en este grupo podría favorecer la expresión de *Fut2* en el intestino.

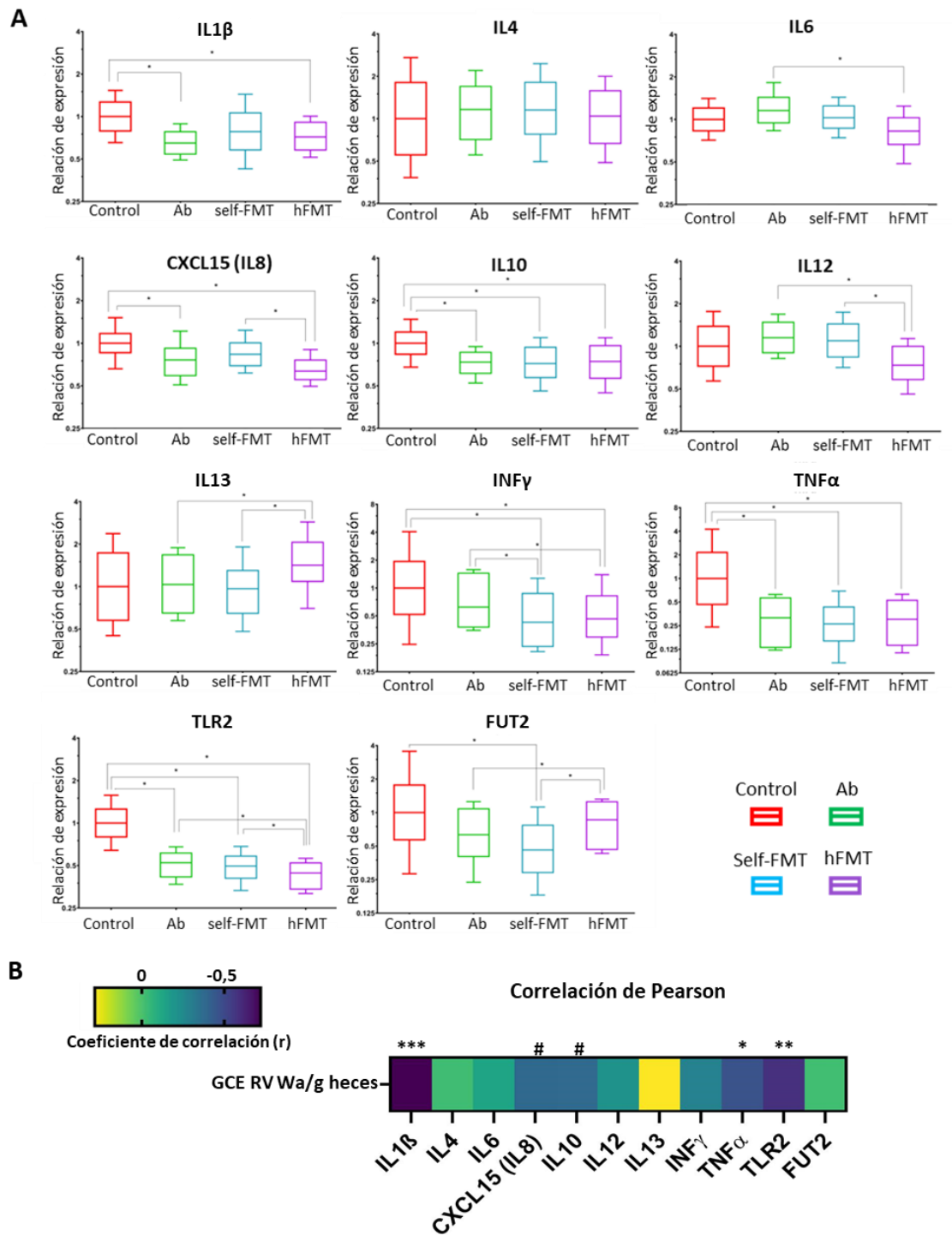


Figura 33. Expresión de marcadores inmunitarios y *Fut2* en el intestino de ratones infectados con rotavirus Wa. A) Expresión de mediadores inmunes y *Fut2* determinada mediante RT-qPCR a los 7 dpi. El análisis fue realizado con la herramienta REST. *Significancia estadística ($p < 0,05$, aleatorización por pares). **B)** Mapa de calor de la matriz de correlación de Pearson entre el nivel de expresión génica de los mediadores inmunológicos y *Fut2* y el nivel de excreción (GCE/g). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; # $p = 0,06$.

VIII. RESULTADOS

2.1.6. Relación entre la microbiota, el hospedador y rotavirus

En este punto, hemos determinado aquellos grupos bacterianos característicos de cada tratamiento y hemos analizado el nivel de expresión de los marcadores inmunológicos y del gen *Fut2* en cada grupo de ratones. Además, hemos analizado la correlación de la infección por RV Wa con la abundancia de determinados géneros bacterianos y con el nivel de expresión de diferentes tipos de componentes inmunitarios y *Fut2*. Tras estos análisis, nos resultó interesante evaluar la correlación de la expresión de los mediadores inmunológicos con la abundancia de los géneros bacterianos relacionados con la infección.

Recordemos que los géneros *Oscillospira*, *Lactobacillus*, *Akkermansia*, *Allobaculum*, *Adlercreutzia*, *Odoribacter*, *Streptococcus*, *Ruminococcus* y *Bifidobacterium* se han considerado como restrictivos de la replicación por RV, mientras que *Lactococcus* spp., las enterobacterias en general y *Proteus* spp. correlacionaron positivamente con el título viral, considerándose permisivos de la infección (Figura 32). Por otro lado, el análisis de correlación entre la carga viral y la expresión de mediadores inmunológicos resultó en una relación negativa con *Il1 β* , *Cxcl15* (*IL8*), *Il10*, *Tnfa* y *Tlr2* (Figura 33B). En la Tabla 13 se muestran los géneros asociados con la infección y el índice de correlación de Pearson (*r*) resultante del análisis con cada uno de los mediadores inmunológicos (con valores de significancia menores de 0,05). Es interesante que la dirección de la correlación entre los factores inmunológicos anteriores y los géneros influenciados con la infección es la inversa a la que toma cada una de estas variables respecto al nivel de carga viral. Es decir, los géneros restrictivos de la excreción viral correlacionaron positivamente con estos mediadores inmunológicos, mientras que los géneros favorecedores de la excreción lo hicieron de manera negativa. Si analizamos en detalle la Tabla 13, observamos que *IL1 β* es la citocina que correlaciona con todos los géneros asociados a la infección (a excepción del género *Akkermansia*). Esta citocina fue la que correlacionó con mayor fuerza con la excreción viral (Figura 33B). En cuanto a los géneros permisivos, sólo las enterobacterias correlacionaron con todos los moduladores inmunes asociados a la infección. Por último, tal y como podemos observar, la mayoría de los géneros tuvieron una correlación intensa con la expresión de *Tlr2* en el intestino.

VIII. RESULTADOS

Aunque no se asociaron directamente con el título viral, el resto de los géneros analizados correlacionaron en mayor o menor medida con los mediadores inmunológicos (Tabla Ap1 del Apéndice), por lo que pudieron tener un efecto indirecto sobre la excreción viral. En general, los resultados mostraron una correlación positiva de la microbiota del ratón con los moduladores proinflamatorios y negativa con los antiinflamatorios. Esta relación fue inversa para los géneros propios de la microbiota humana (*Erwinia*, *Megasphaera*, *Bacteroides* y *Parabacteroides*). Hay que destacar que la expresión génica del receptor TLR2 se vio influenciada, positiva o negativamente, por todos los géneros analizados.

Tabla 13. Correlación entre la abundancia de géneros asociados con la infección por rotavirus Wa y la expresión de mediadores inmunológicos. Se muestran los índices de correlación de Pearson (r) con resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$). NA: no asignadas. Se marca en negrita los índices de correlación considerados como relación fuerte ($r > 0,70$).

	Géneros	Mediadores									
		IL1 β	CXCL15 (IL8)	IL10	TNF α	TLR2	INF γ	IL6	IL12	IL4	IL13
Restringidos	<i>Oscillospira</i>	0,46			0,52	0,73				-0,48	-0,57
	<i>Lactobacillus</i>	0,64	0,71	0,47	0,53	0,65	0,51				
	<i>Akkermansia</i>										
	<i>Allobaculum</i>	0,53	0,51	0,51	0,87	0,90	0,56				
	<i>Adlercreutzia</i>	0,58	0,55	0,59	0,83	0,95	0,62				
	<i>Odoribacter</i>	0,43	0,43	0,42	0,80	0,81	0,45			-0,40	
	<i>Streptococcus</i>	0,58	0,54	0,62	0,66	0,85	0,64				
	<i>Ruminococcus</i>	0,43	0,40	0,47	0,67	0,88	0,41				
	<i>Bifidobacterium</i>	0,43	0,41	0,46	0,72	0,89	0,41			-0,39	
Permisivos	<i>Lactococcus</i>	-0,45						0,40			
	<i>Enterobacterias</i> NA	-0,52	-0,62	-0,43	-0,60	-0,73	-0,46				
	<i>Proteus</i>	-0,54			-0,40						

VIII. RESULTADOS

Para finalizar, nos propusimos analizar la correlación entre el nivel de expresión del *Fut2* con los 24 biomarcadores bacterianos resultantes del análisis LEFse (Figura 31). De todos ellos, se encontró correlación con 13 géneros (Tabla 14).

Recordemos que la expresión de este gen no correlacionó con el título viral pero sí se vio afectado por la disminución de la riqueza y la diversidad microbiana, pues fue menor en el grupo self-FMT con respecto al grupo Control (Figura 33A). Como observamos en la Tabla 14, la expresión de *Fut2* correlacionó significativamente y de forma negativa con la presencia de *Akkermansia* spp. ($p = 0,03$) y *Sutterella* spp. ($p = 0,01$), mientras que lo hizo de forma positiva con el resto de los géneros, entre los que se incluyen algunos relacionados con la restricción de la replicación. Se muestran con asterisco los 4 géneros cuyo nivel de significancia fue de $0,05 < p < 0,1$. No se han incluido en la tabla los géneros sin correlación ($p > 0,1$). Curiosamente, *Akkermansia* y *Sutterella* son los dos géneros más aumentados en el grupo self-FMT con respecto al resto de ratones (Figura 27). No se encontró correlación significativa con los géneros asociados al grupo que recibió el trasplante de microbiota humana. Sin embargo, es importante recordar que la expresión de *Fut2* mostró un aumento significativo en el grupo de trasplante de microbiota humano respecto al murino. Una de las diferencias en cuanto a presencia de grupos bacterianos entre estos dos trasplantes, es que el grupo hFMT presentó al género *Megasphaera* en su composición, proveniente de la microbiota donante humana. Se incluye en la Tabla 14 a este grupo, cuyo valor de significancia en la correlación con la expresión de *Fut2* fue de 0,1.

En resumen, todos los géneros bacterianos considerados restrictivos de la infección por RV están presentes en distintos porcentajes en la microbiota de los ratones Control. Recordemos que la riqueza y diversidad de este grupo fue mayor en comparación con los ratones que recibieron tratamientos (Figura 29) y que es en este grupo donde podemos observar una mayor expresión de los mediadores inmunológicos asociados con la replicación, así como de la expresión de *Fut2*. Es decir, la mayor riqueza y diversidad bacteriana sugiere un mejor funcionamiento del sistema inmune y permite una mejor comunicación entre las bacterias comensales, el sistema de defensa y la glicosilación epitelial para controlar la infección viral.

VIII. RESULTADOS

Tabla 14. Correlación entre la abundancia de los géneros bacterianos y la expresión de *Fut2* en los ratones del experimento de infección con rotavirus Wa. Se muestran los índices de correlación de Pearson (r) con resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Resultados con valor de significancia de 0,06 (a) y de 0,1 (b).

	Géneros restrictivos de la excreción viral						Géneros sin efecto sobre la excreción viral						
	<i>Akkermansia</i>	<i>Allobaculum</i>	<i>Adlercreutzia</i>	<i>Odoribacter</i>	^a <i>Ruminococcus</i>	^a <i>Bifidobacterium</i>	<i>Dorea</i>	<i>Clostridium</i>	^a <i>Dehalobacterium</i>	^a <i>Turicibacter</i>	^a <i>Streptococcus</i>	^b <i>Megasphaera</i>	<i>Sutterella</i>
<i>Fut2</i>	-0,45	0,51	0,47	0,48	0,34	0,36	0,62	0,60	0,37	0,36	0,36	0,24	-0,51

2.2. Norovirus

2.2.1. Impacto de los tratamientos en la configuración de la comunidad bacteriana

Al igual que en el experimento de ratones infectados con RV, analizamos la diversidad beta mediante PCoA de los distintos grupos de ratones con el objetivo de evaluar si los tratamientos pudieron modificar el perfil de la microbiota murina.

De nuevo, los tratamientos tuvieron un efecto sobre la composición microbiana de los ratones (Figura 34) y esto fue confirmado por el análisis estadístico (PERMANOVA valor $F = 53,64$; $R^2 = 0,91$; $p < 0,001$). En este caso, los ejes 1 y 2 explicaron el 36,9 % y 34,4 % de la varianza. En la gráfica se puede observar cómo el grupo tratado con antibióticos se separó significativamente del resto de grupos a lo largo del eje 1, mientras que los grupos Control, self-FMT y hFMT se distanciaron entre ellos a lo largo del eje 2. De nuevo, el perfil de la microbiota del donante fue más similar al perfil microbiano del grupo hFMT.

VIII. RESULTADOS

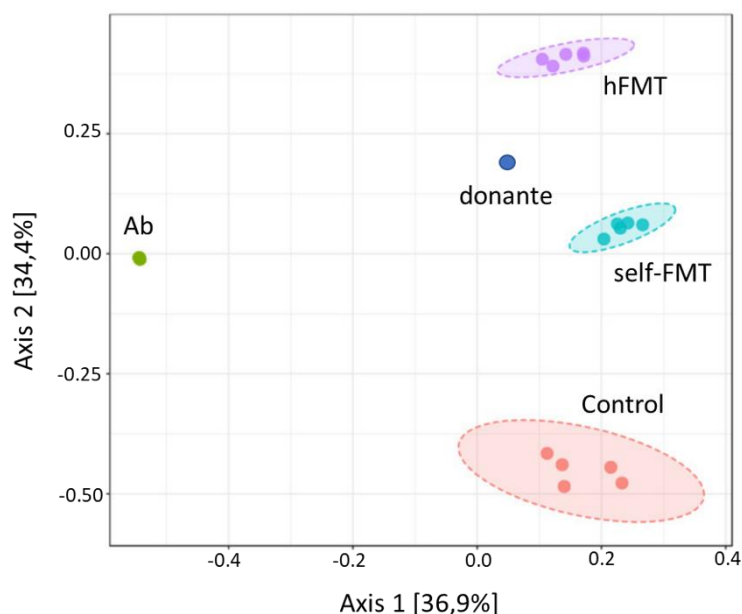


Figura 34. Diversidad beta a nivel de OTU en ratones infectados con norovirus GII.4 Sydney [P16]. Se muestra la gráfica PCoA de los distintos grupos de ratones, medida mediante los índices de disimilitud de Bray-Curtis. Control: grupo sin tratamiento; Ab: grupo tratado con antibióticos durante todo el experimento; self-FMT: grupo con autotrasplante de microbiota; hFMT: grupo con trasplante de microbiota humana; donante: microbiota de heces humanas recibidas por el grupo hFMT.

Ya hemos visto cómo, en los ratones infectados con RV, los tres tratamientos distintos causaron una remodelación profunda de la microbiota y todos los grupos pudieron distinguirse por sus perfiles microbianos en las heces. Como era de esperar, también se produjo una alteración en la composición de la microbiota de los ratones del presente experimento (Figura 35).

En la Figura 35A podemos observar los filos con mayor representación en cada grupo de ratones y en la microbiota del donante. En general, el grupo Control presentó cinco grandes filos, siendo el filo *Bacillota* el mayor representante de su composición microbiana (80 %). Tras el autotrasplante, la distribución se modificó, siendo el filo *Verrucomicrobiota* el mayor constituyente de los ratones self-FMT (41 %). En el caso del trasplante de microbiota humana, podemos observar que son tres filos los que figuraron la mayoría de su composición, con el filo *Bacteroidota* (antiguo *Bacteroidetes*) representando el 55 % de su microbiota. Nótese que el filo *Actinomycetota*, presente en la microbiota del donante, se perdió durante el trasplante de microbiota humana al ratón. Se puede ver cómo los miembros del filo *Pseudomonadata* y *Bacteroidota* se recuperaron tras el trasplante de microbiota (tanto humana como murina) pero no soportaron la administración continua de antibióticos del grupo Ab. Este grupo se vio

VIII. RESULTADOS

afectado considerablemente en cuanto a riqueza y diversidad, pues sólo el filo *Bacillota* representó el 99 % de su composición bacteriana.

Si nos fijamos en la Figura 35C, el género mayoritario del filo *Bacillota* en los grupos que recibieron tratamiento correspondió a *Lactococcus* spp., siendo prácticamente el único género presente en el grupo Ab (99 %). A diferencia de la microbiota del experimento de infección con RV, en este caso, el grupo Ab prácticamente no presentó enterobacterias en su composición (0,01 %). En el caso del grupo hFMT, su composición microbiana estuvo formada por una mezcla más diversa y homogénea de los géneros *Bacteroides* (42 %), *Parabacteroides* (13 %), *Lactococcus* (14 %) y una gran parte de géneros no asignados de enterobacterias (29 %) (Figura 35B).

2.2.2. Cuantificación de la carga viral tras la infección por norovirus

El diseño experimental para el estudio del efecto de la microbiota humana en la infección de HuNoV en el modelo de ratón fue el mismo que el descrito para el caso de RV.

En la Figura 36A se muestra la evolución del título de NoV GII.4 Sydney 2012 [P16] excretados en las heces de los ratones durante los 6 días tras la infección. Se puede observar que en el dpi 1, los ratones Ab y hFMT mostraron una menor cantidad de virus excretados en comparación a los ratones Control y self-FMT, siendo esta diferencia significativa para el grupo Ab (Control: $7,3 \times 10^4$; self-FMT: $6,7 \times 10^4$; Ab: $5,8 \times 10^4$; hFMT: $5,9 \times 10^4$ GCE/g de heces). Los niveles detectados de virus en los ratones Control y self-FMT sólo fueron detectados a las 24 h de la infección (dpi 1), resultando indetectable en el dpi 2. Cabe mencionar que en estos grupos sólo se detectaron copias genómicas de NoV en 4 (Control) y 3 (self-FMT) de los 5 ratones del grupo (Figura 36B).

Por el contrario, en comparación con el dpi 1 de los animales Control, la excreción viral en el dpi 2 de los ratones tratados con antibióticos (Ab) fue 25 veces mayor ($1,8 \times 10^6$ GCE/g). Al comparar los ratones con trasplante de microbiota, el grupo hFMT fue 1,9 veces mayor ($1,8 \times 10^6$ GCE/g) al del grupo self-FMT (nivel indetectable).

VIII. RESULTADOS

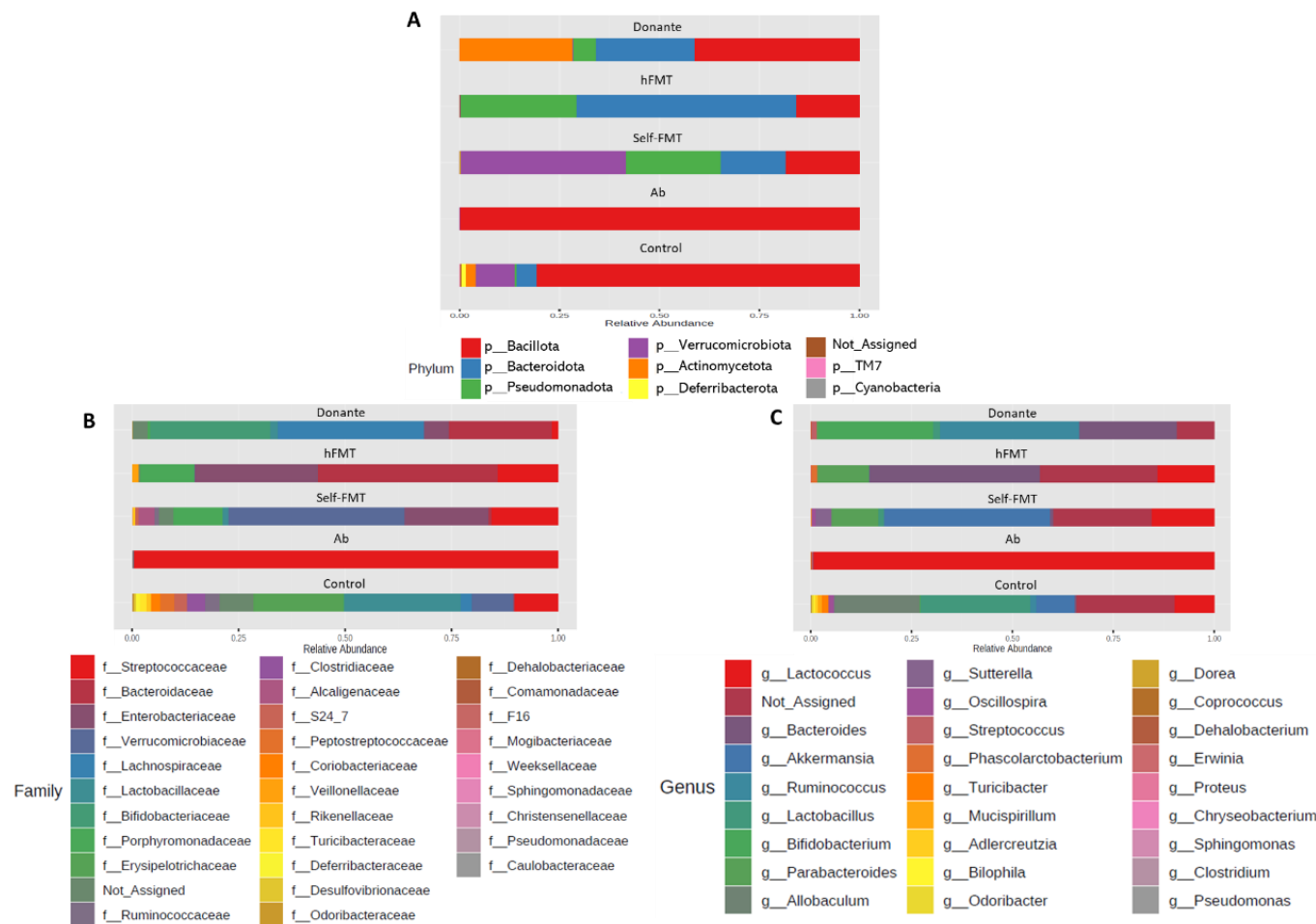


Figura 35. Distribución de taxones bacterianos en los grupos de ratones infectados con norovirus GII.4 Sydney 2012 [P16]. Se muestra la abundancia relativa (en porcentaje) de taxones bacterianos en los ratones infectados con NoV GII.4 Sydney 2012 [P16] a nivel de filo (A), familia (B) y género (C). La secuenciación del ADNr 16S fue realizada antes de la infección viral. Donante: microbiota humana utilizada para el trasplante del grupo hFMT; hFMT: ratones con trasplante de microbiota humana; self-FMT: ratones con trasplante de microbiota murina; Ab: ratones tratados con antibiótico durante el experimento; Control: grupo sin tratamiento.

VIII. RESULTADOS

De nuevo, los niveles más bajos de NoV detectados en los animales Control y self-FMT, así como su rápida eliminación indican una replicación ineficiente (incluso nula), en contraste con la prolongada excreción viral en los ratones tratados con antibióticos (Ab). En este caso, y a diferencia del experimento de infección con RV, en el grupo hFMT sólo se detectó virus en el dpi 1 ($5,9 \times 10^4$ GCE/g) y, tras un ligero aumento, en el dpi 2 ($1,3 \times 10^5$ GCE/g), siendo indetectable a partir del dpi 3. En este caso, el máximo nivel detectado de excreción viral ($1,8 \times 10^6$ GCE/g) fue de un orden menor al del inóculo.

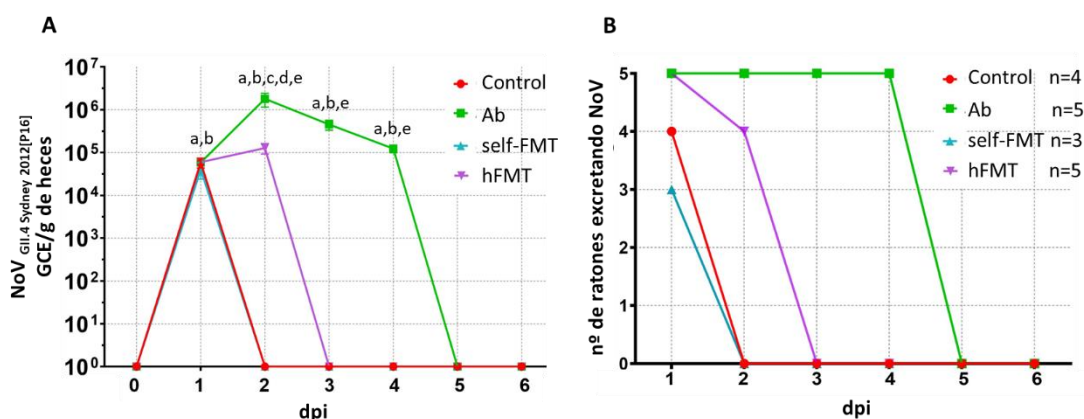


Figura 36. Excreción de norovirus GII.4 Sydney [P16] en las heces de ratones. A) Se presenta el GCE/g de heces para los ratones Control, los ratones tratados con antibióticos (Ab), los ratones con autotrasplante de microbiota fecal (self-FMT) y los ratones trasplantados con microbiota humana (hFMT). Se tomaron muestras de heces de los ratones hasta el dpi 6. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, prueba t de Student) en los GCE/g entre los grupos: a. Ab vs. Control; b. Ab vs. self-FMT; c. hFMT vs. Control; d. hFMT vs. self-FMT; e. Ab vs. hFMT; f. Control vs. self-FMT). Se muestra la media de los replicados $\pm$ SEM. El límite de detección fue de 10^4 GCE/g de heces. **B)** Se muestra el número total de ratones que excretan NoV en cada dpi, con el número inicial de ratones con excreción de virus (n). Ab: antibiótico; self-FMT: trasplante de microbiota fecal propia; hFMT: trasplante de microbiota fecal humana. dpi: días postinfección.

2.2.3. Efecto de la abundancia y de la diversidad sobre la infección

Los resultados de la excreción viral indican que el tratamiento con antibióticos fue el responsable de la permisividad a la infección por HuNoV en ratones, lo que señala a la abundancia de la microbiota como un factor clave en la infectividad de HuNoV en este modelo animal. Después del tratamiento con antibióticos, el número de bacterias, calculado mediante qPCR como GCE del ADNr 16S por gramo de heces, se redujo drásticamente (85 %, IC 95 % 68,6 % - 101,8 %). Los ratones que recibieron uno u otro trasplante mostraron un aumento en el número de bacterias tras el tratamiento, aunque no se alcanzaron los niveles originales presentes en los animales Control (Figura 37).

VIII. RESULTADOS

El análisis de correlación entre la cantidad de bacterias y el título viral resultó estadísticamente significativo ($p = 0,01$) y con un valor de $r = -0,55$.

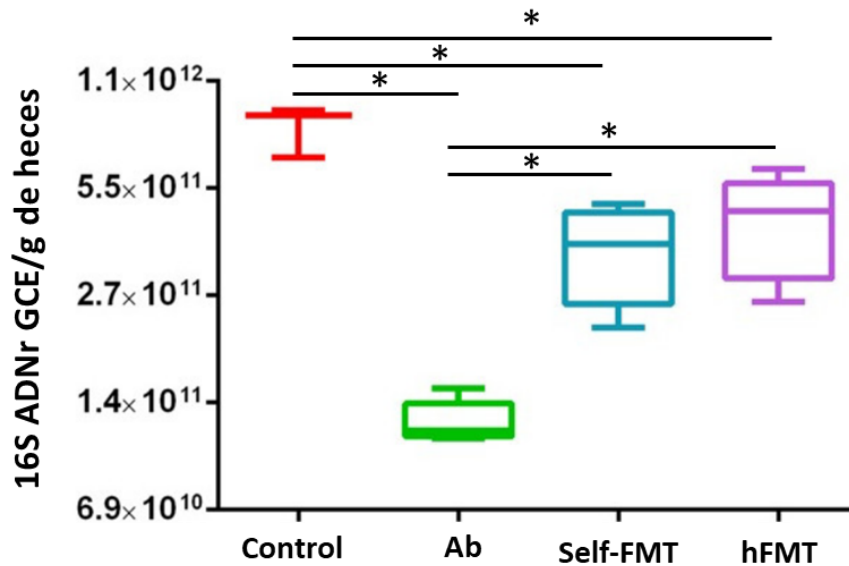


Figura 37. Cuantificación de bacterias totales en las heces de ratones previa a la infección con norovirus GII.4 Sydney 2012 [P16]. La cuantificación se realizó mediante qPCR del ADNr 16S. Se presenta la media de los GCE/g de heces ($\pm$ los valores mínimo y máximo) para los distintos grupos de ratones: ratones sin tratamiento (Control), ratones tratados con antibióticos (Ab), ratones sometidos a autotrasplante de microbiota fecal (self-FMT) y ratones con trasplante de microbiota fecal humana (hFMT). *Significancia estadística ($p < 0,05$, prueba t de Student).

La composición de la microbiota fecal en los animales antes de la infección con NoV fue determinada mediante secuenciación del ADNr 16S, lo que mostró, al igual que en el experimento de infección con RV, que la diversidad alfa se vio severamente afectada por los tratamientos (Figura 38).

Recordemos que el índice Chao1 hace referencia a la riqueza dentro de una muestra, teniendo en cuenta la abundancia relativa de los taxones (tanto los observados como los no observados). En nuestros resultados se puede ver cómo la riqueza se redujo en todos los grupos en comparación con el Control ($p = 7,29 \times 10^{-13}$; valor $F = 198,34$, ANOVA), pero fue mayor en los animales del grupo hFMT. Por otro lado, el índice de Shannon tiene en cuenta tanto el grado de riqueza (abundancia de taxones) como la uniformidad de la distribución de la microbiota en cada grupo. Este índice también fue menor en los grupos tratados en comparación al grupo Control ($p = 2,32 \times 10^{-13}$; valor $F = 229,68$, ANOVA). De los ratones tratados, el grupo hFMT presentó los mayores valores

VIII. RESULTADOS

Chao1 y Shannon, lo que significa que su composición bacteriana está constituida por una mayor abundancia de taxones y, además, distribuidos equitativamente.

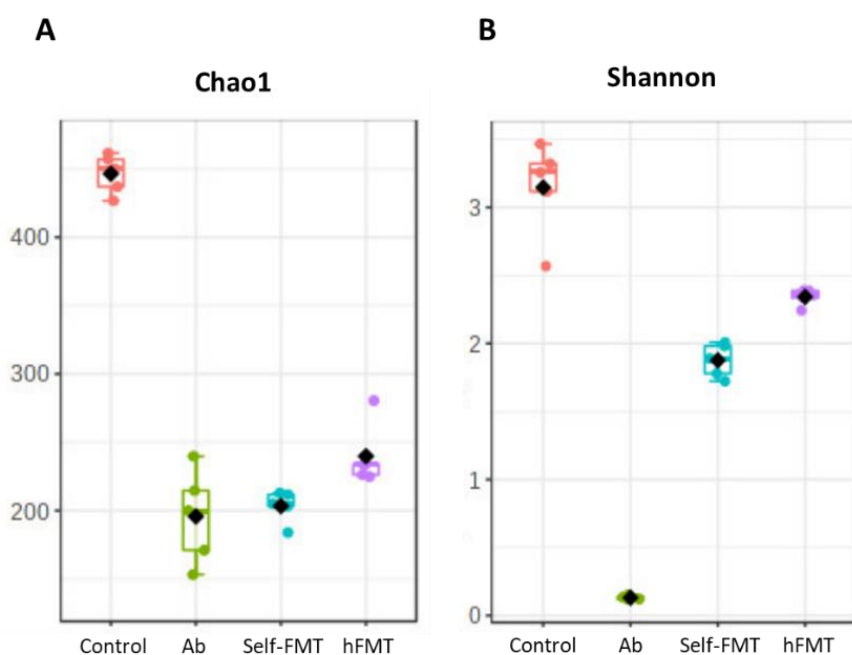


Figura 38. Diversidad alfa a nivel de OTU en ratones infectados con norovirus GII.4 Sydney 2012 [P16]. Se muestran los índices Chao1 (A) y Shannon (B) para el conjunto de datos analizado. Control: grupo sin tratamiento; Ab: grupo tratado con antibióticos durante todo el experimento; self-FMT: grupo con autotrasplante de microbiota; hFMT: grupo con trasplante de microbiota humana.

2.2.4. Marcadores bacterianos con efecto sobre la infección por norovirus

Una vez evaluado el porcentaje de abundancia de cada taxón en los distintos grupos de ratones, nos propusimos analizar aquellos grupos bacterianos cuya presencia explicaba significativamente las diferencias debidas al tratamiento (grupo Control, grupo Ab, grupo self-FMT y grupo hFMT). De esta forma, en el análisis LEfse se obtuvieron 26 biomarcadores con diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de ratones ($p < 0,05$ en test de Kruskal-Wallis, ajustado por FDR), con puntuaciones LDA superiores a 2,5 (Figura 39).

VIII. RESULTADOS

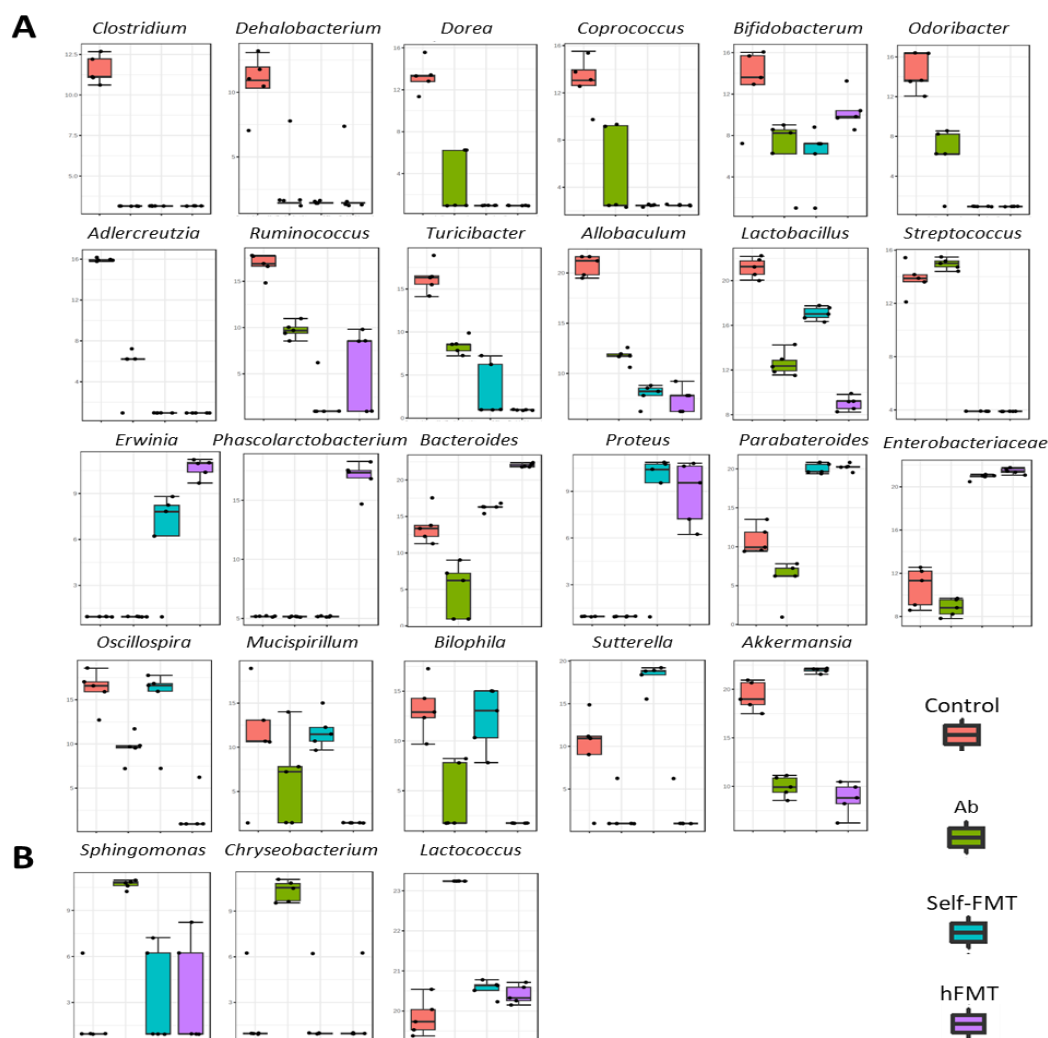


Figura 39. Biomarcadores bacterianos (LEFse) con diferencias entre los grupos de ratones infectados con norovirus GII.4 Sydney 2012 P[16]. Los diferentes diagramas de caja representan el número de lecturas de cada género, a excepción de las enterobacterias, normalizado por TSS (datos en escala logarítmica en base 2). Se muestran los géneros con puntuación LDA > 2,5. **A)** Taxones sin correlación con el título viral; **B)** Taxones con correlación con el título viral. Rojo, ratones Control; verde, ratones tratados con antibióticos (Ab); azul, ratones self-FMT; magenta, ratones hFMT.

Seguidamente, se analizó la posible influencia de determinados taxones bacterianos sobre la susceptibilidad a la infección por NoV GII.4 Sydney 2012 [P16] (Figura 40). Para ello, se extrajeron los datos del número de lecturas por ratón de cada uno de los 26 taxones (datos rarefaccionados al mínimo de la librería) y se hizo un análisis de correlación de Pearson respecto al título viral de cada uno de los ratones a las 48h de la infección.

En este caso encontramos 21 géneros que no correlacionaron con el nivel de excreción viral (Figura 39A). Los géneros *Clostridium*, *Dehalobacterium*, *Dorea*, *Coprococcus*, *Bifidobacterium*, *Odoribacter*, *Adlercreutzia*, *Ruminococcus*, *Turicibacter* y

VIII. RESULTADOS

Allobaculum, presentes en el grupo Control con un porcentaje de abundancia entre el 0,01 % (*Clostridium* spp.) y el 21,14 % (*Allobaculum* spp.), se vieron influenciados negativamente por el tratamiento con antibióticos y no pudieron ser restaurados en los grupos tratados. De nuevo, *Allobaculum* spp. fue uno de los grupos mayoritarios presentes en los ratones Control y no resistió la administración de antibióticos (aparece en el grupo Ab sólo en un 0,04 %). *Lactobacillus* también es otro género abundante en el grupo Control (27,11 %) y fue restaurado mínimamente en los ratones que recibieron trasplante de microbiota murina (1,45 %), pero no en los grupos Ab (0,08 %) y hFMT (0,01 %).

El efecto derivado por el trasplante de microbiota también influyó sobre la abundancia de determinados géneros bacterianos (Figura 39A). Los géneros *Erwinia* y *Phascolarctobacterium* sólo estuvieron presentes en el grupo hFMT (0,02 % y 1,63 %, respectivamente), lo que indica que provinieron de la microbiota humana. De nuevo, el género *Bacteroides* fue el grupo mayoritario de la microbiota de los ratones hFMT (42,37 %) y los resultados indican que, de nuevo, la mayoría de estas bacterias se recibieron de la microbiota del donante (18,93 %), pues en el grupo Control sólo presentó un 0,44 % de este género. Por otro lado, dos géneros resultaron favorecidos tanto por el trasplante de microbiota murina como humana. *Proteus* spp. apareció en la composición bacteriana del ratón muy ligeramente (0,01 % tanto en self-FMT como en hFMT) mientras que el porcentaje de abundancia del género *Parabacteroides* en estos dos grupos fue mayoritario (11,58 % en self-FMT y 12,83 % en hFMT). En la composición original de los ratones no tratados este grupo representó el 0,03% mientras que el donante presentó un 0,41 %. Posiblemente, la presencia de este género en el grupo hFMT también sea originaria del donante mientras que la del grupo self-FMT provenga de la microbiota de ratón. Además, en el grupo Ab, no se halló a este género.

En comparación al experimento con RV, el grupo Ab no presentó enterobacterias en su composición (0,08 %) y, además, no se correlacionó con la infección (Figura 40). Pudimos observar que este grupo bacteriano se vio afectado por la administración de antibióticos y sólo se restauró tras el trasplante de microbiota. Otro género influenciado por el trasplante, aunque de manera negativa, fue *Streptococcus*, ya que no se recuperó en los grupos trasplantados. Por último, aunque en baja proporción, los géneros

VIII. RESULTADOS

Bilophila, *Oscillospira*, *Mucispirillum*, *Sutterella* y *Akkermansia* lograron reimplantarse ligeramente tras el trasplante de microbiota murina (pero no en el grupo hFMT). Al igual que en el experimento con RV, los géneros *Sutterella* y *Akkermansia* se vieron favorecidos por el autotrasplante y *Akkermansia* spp. resultó el mayor representante de la microbiota del grupo self-FMT (41,22 %).

En la Figura 39B se presentan los grupos bacterianos que correlacionaron con el nivel de liberación viral en los ratones a las 48h de la infección. Como hemos comentado anteriormente, en la Figura 40 se muestra un mapa de calor de la correlación de Pearson (r) entre la abundancia de los taxones y el nivel de excreción viral. Recordemos que el grupo Ab fue el que excretó mayor cantidad de virus y durante más tiempo (96h) que el resto de los grupos, seguido del grupo hFMT. En los grupos control y self-FMT sólo se detectó virus a las 24h de la infección (Figura 34). En nuestros resultados, los géneros *Chryseobacterium*, *Sphingomonas* y *Lactococcus* correlacionaron positivamente con el título viral, por lo que estos géneros pueden considerarse como permisivos a la infección por NoV GII.4 Sydney 2012 [P16]. Es interesante mencionar que *Chryseobacterium* spp. y *Sphingomonas* spp. sólo se encuentran representando el 0,01 % de la composición bacteriana del grupo Ab mientras que el género *Lactococcus*, como ya se ha comentado anteriormente, es prácticamente el único representante de este grupo (99,26 %). En este estudio no se ha encontrado ningún grupo taxonómico asociado a la restricción de la replicación de NoV GII.4 Sydney 2012 [P16].

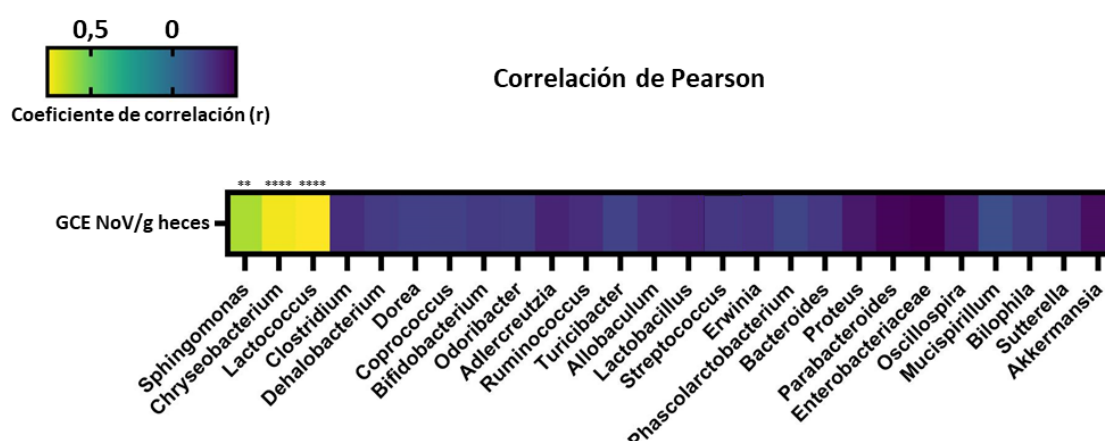


Figura 40. Mapa de calor de la matriz de correlación de Pearson entre el nivel de excreción viral de norovirus GII.4 Sydney 2012 P[16] y la abundancia de los taxones bacterianos. Se incluye el valor de correlación (r) según el color y el valor de significancia: ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$.

VIII. RESULTADOS

2.2.5. Efecto de los tratamientos y de la infección por norovirus sobre la expresión de biomarcadores inmunológicos y del gen *Fut2*

También se evaluó el efecto de los distintos tratamientos (antibióticos y trasplante de microbiota) y la excreción de NoV GII4 Sydney 2012 [P16] sobre la expresión génica de marcadores proinflamatorios (IL1 β , IL6, CXCL15 (IL8), IL12, TNF α , IFN γ), antiinflamatorios (IL4, IL10 y IL13), el receptor TLR2, así como del gen *Fut2* (Figura 41A). En primer lugar, se describen los resultados (extraídos de la herramienta REST) evaluando el efecto de los antibióticos sobre la expresión usando como referencia el grupo Control. Posteriormente, se citan aquellos marcadores relacionados con el título viral y, por último, se describen los componentes influenciados por el trasplante de microbiota utilizando como referencia el grupo Ab. Recordemos que este grupo recibió el mismo tratamiento que los grupos self-FMT y hFMT excepto el trasplante y que, en estos grupos, la diversidad alfa resultó ligeramente restaurada tras el FMT. Recordemos también que el grupo Ab liberó mayor cantidad de partículas virales y durante más tiempo que el resto de los grupos, siguiéndole los ratones trasplantados con microbiota humana (Figura 36).

En primer lugar, el tratamiento con antibióticos afectó a la expresión de *Il4*, *Tnf α* y *Tlr2* (Figura 41A). La expresión de *Il4* aumentó considerablemente, con valores de 2,39 veces en Ab, 2,38 veces en hFMT y 2,09 veces en self-FMT. De nuevo, *Tnf α* y *Tlr2* se redujeron en un 60 % y 53 % en Ab; 40 % y 36 % en hFMT; 34 % y 28 % en self-FMT, respectivamente. Sin embargo, *Tnf α* sólo mostró una reducción con valores significativos en el grupo Ab ($p = 0,01$). En la Figura 41B se presenta un mapa de calor con la correlación de Pearson (r) entre los marcadores inmunológicos y el título viral a las 48 h de la infección. Como se puede observar, estos tres mediadores se correlacionaron positiva o negativamente con la titulación viral. Mayores niveles de expresión de *Il4* correlacionó moderadamente con una mayor excreción de HuNoV, mientras que menores niveles de *Tnf α* y, sobre todo de *Tlr2*, correlacionaron con la mayor cuantificación viral. La expresión de *Il12* también correlacionó ligeramente con el título viral (con un nivel de significancia de 0,06). Nótese que esta citocina resultó ligeramente aumentada en los grupos Ab y hFMT.

VIII. RESULTADOS

Por otro lado, *Cxcl15* (*IL8*) se redujo en los grupos con trasplante, con valores significativos en el grupo self-FMT (30 %, $p = 0,02$) (Figura 41A). Los niveles de expresión de *Il13*, aunque aumentaron en los tres grupos tratados con antibióticos, fueron considerablemente mayores en los ratones trasplantados (2,57 veces en self-FMT, $p = 0,05$; 2,71 veces en hFMT, $p = 0,007$). Por último, los niveles de expresión de *Il1 β* , *Il6*, *Il10* e *Ifn γ* no difirieron significativamente entre los grupos experimentales y los animales Control ($p > 0,05$), aunque sí se observó cierta tendencia en la reducción de la expresión de *Ifn γ* en todos los grupos tratados, siendo menor en el grupo self-FMT. Cuando evaluamos el efecto del trasplante sobre la expresión de los marcadores inmunológicos (grupo Ab como referencia), observamos un aumento en los niveles de expresión de *Tnf α* y *Tlr2* en los dos grupos trasplantados ($p < 0,05$), es decir, en los ratones con mayor diversidad alfa (1,64 y 1,52 veces en self-FMT; y 1,50 y 1,36 veces en hFMT, respectivamente). La expresión de *Cxcl15* se redujo en un 25 % en el grupo self-FMT ($p = 0$) y ligeramente en el grupo hFMT (17 %, $p = 0,07$). La expresión del resto de mediadores no resultó estadísticamente significativa.

Por último, cuando analizamos la expresión de *Fut2*, no encontramos diferencias significativas respecto al grupo Control, aunque sí se observó una tendencia positiva en la expresión de *Fut2* en el grupo self-FMT (1,5 veces, $p = 0,09$) (Figura 41A). Sorprendentemente, el análisis de correlación entre el nivel de expresión de *Fut2* y la titulación viral mostró una relación moderada y negativa (Figura 41B).

VIII. RESULTADOS

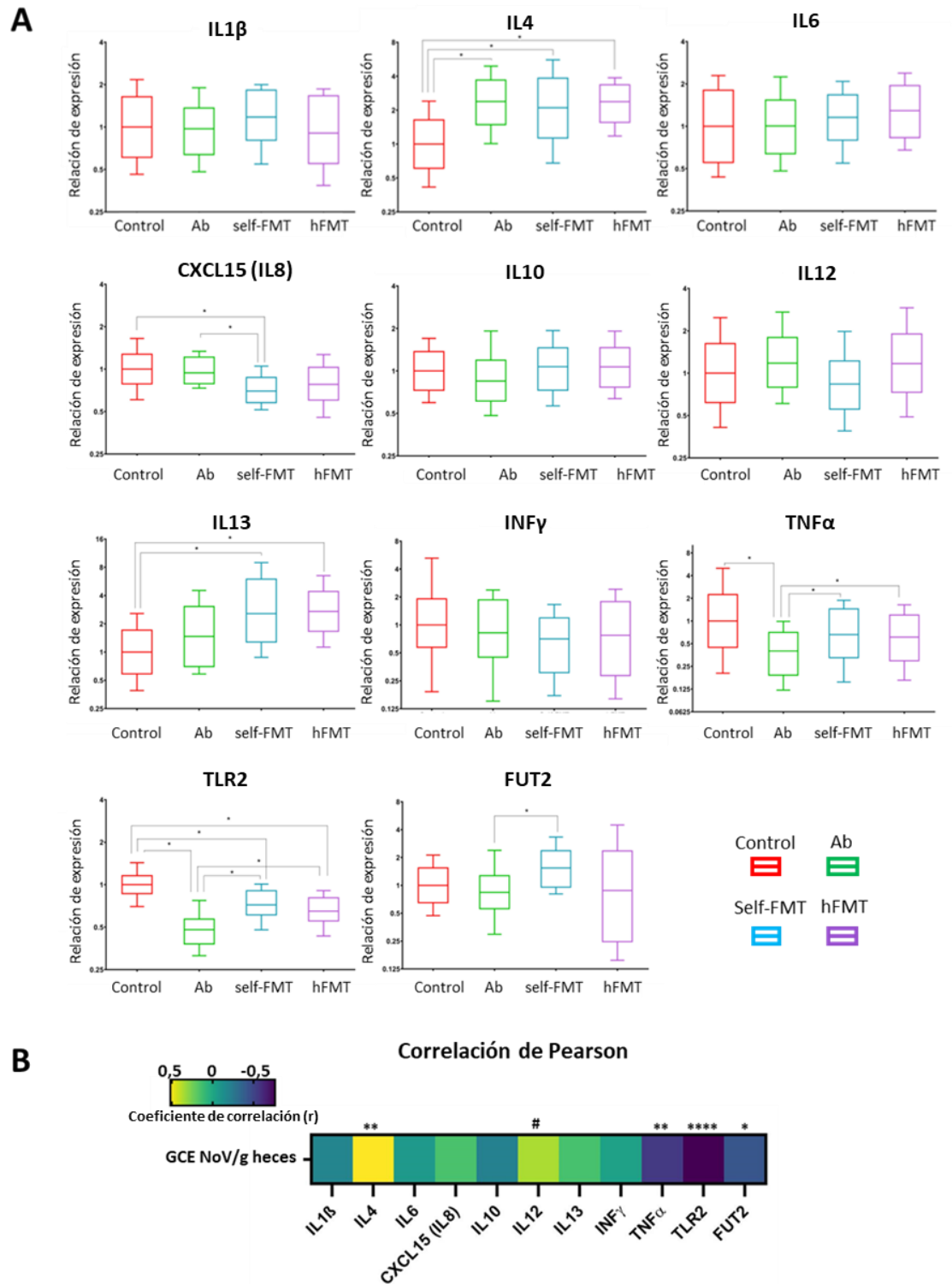


Figura 41. Expresión de marcadores inmunitarios y *Fut2* en el intestino de ratones infectados con norovirus GII.4 Sydney 2012 [P16]. A) Expresión de mediadores inmunes y *Fut2* determinada mediante RT-qPCR a los 7 dpi. El análisis fue realizado con la herramienta REST. *Significancia estadística ($p < 0,05$, aleatorización por pares). **B)** Mapa de calor de la matriz de correlación de Pearson entre el nivel de expresión génica de los mediadores inmunológicos y *Fut2* y el nivel de excreción (GCE/g). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$; # $p = 0,06$.

VIII. RESULTADOS

2.2.6. Relación entre la microbiota, el hospedador y norovirus

Hasta el momento, hemos analizado la influencia de los tratamientos (antibióticos y trasplante fecal) sobre los biomarcadores bacterianos y sobre el nivel de expresión de los moduladores del sistema inmune y del gen *Fut2* en cada grupo de ratones, así como la correlación entre estas variables y la carga viral.

A continuación, y para finalizar, evaluamos la relación entre la abundancia los grupos taxonómicos relacionados con la infección y el nivel de expresión de los moduladores inmunes y *Fut2*.

Recordemos que los géneros *Chryseobacterium*, *Sphingomonas* y *Lactococcus* fueron considerados permisivos de la replicación de NoV en este modelo de ratón. En este caso, la expresión de *Tnfa* y *Tlr2* correlacionó negativamente con estos tres grupos bacterianos (Tabla 15). *Tnfa* correlacionó moderadamente con los tres géneros mientras que *Tlr2* lo hizo con más fuerza ($p = 0,0001$; $p = 0,0001$; $p = 0,0003$, respectivamente). Como se puede observar en la Figura 41B, estos biomarcadores correlacionaron negativamente con la infección.

Por otro lado, *Il4* también se relacionó positivamente con la infección. Sin embargo, el nivel de expresión de esta citocina no ha mostrado datos significativos de correlación con estos tres géneros, aunque mostró cierta tendencia positiva con *Chryseobacterium* spp. ($p = 0,09$) y con *Lactococcus* spp. ($p = 0,09$).

También podemos observar una correlación moderada y negativa de *Il6* y positiva de *Il12* con *Sphingomonas* spp., aunque con valores de significancia de 0,08 y 0,1, respectivamente. *Il12* mostró una correlación con cierta tendencia negativa (al igual que *Il4*) con el título viral.

Por último, aunque no correlacionó con la infección, *Il10*, al igual que *Tnfa* y *Tlr2*, también mostró una correlación negativa con estos géneros. Nótese que los valores de mayor correlación fueron con el género *Sphingomonas* en los casos de *Il10* y *Tlr2*.

VIII. RESULTADOS

Tabla 15. Correlación entre la abundancia de géneros asociados con la infección por norovirus GII-4 Sydney 2012 [P16] y la expresión de mediadores inmunológicos. Se muestran los índices de correlación de Pearson (r) con resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$). *Nivel de significancia $0,05 < p < 0,1$. Se marca en negrita los índices de correlación considerados como relación fuerte ($r > 0,70$).

		Mediadores									
		IL1 β	CXCL15 (IL8)	IL10	TNF α	TLR2	INF γ	IL6	IL12	IL4	IL13
Permisivos	Géneros										
	<i>Chryseobacterium</i>			-0,36*	-0,54	-0,64				0,31*	
	<i>Sphingomonas</i>			-0,45	-0,54	-0,72		-0,33*	0,28*		
	<i>Lactococcus</i>			-0,32*	-0,54	-0,69				0,32*	

Aunque no se relacionaron directamente con el título viral, se analizó la correlación entre el resto de los géneros resultantes del análisis Lefse y los diferentes moduladores inmunológicos (Tabla Ap2 del Apéndice). En general, los resultados mostraron una relación indirecta de estos géneros con el título viral, posiblemente mediada a través de la modulación del sistema inmune innato. La mayoría de la microbiota propia del ratón se correlacionó positivamente con la expresión de *Tlr2* mientras que lo hizo de forma negativa con *Il4* e *Il13* (citocinas antiinflamatorias).

Por último, aunque la expresión de *Fut2* disminuyó con el aumento del título viral, no correlacionó con ninguno de los géneros resultantes del análisis Lefse.

En resumen, el menor número de bacterias halladas tras los tratamientos correlacionaron con un mayor título de NoV. Además, la presencia de los géneros *Chryseobacterium*, *Sphingomonas* y *Lactococcus* se asoció con la detección de un mayor número de partículas virales en las heces y, posiblemente, sea favorecida por la disminución de la respuesta de TNF α y TLR2. Independientemente de estos géneros, los grupos con mayor detección de NoV mostraron un aumento en la expresión de *Il4*.

IX.DISCUSIÓN



IX. DISCUSIÓN

Desde la demostración de que la microbiota desempeña un papel importante en la infección por virus que afectan el intestino^{110,114}, se ha intentado determinar el papel de las bacterias intestinales sobre los virus más relevantes que causan gastroenteritis, como RV y NoV⁸⁸. La microbiota intestinal ha surgido como un actor fundamental en las interacciones entre los virus entéricos y el hospedador, y se ha demostrado que puede tener efectos tanto positivos como negativos en la infectividad viral, los cuales están mediados por diferentes mecanismos^{88,204–206}.

Desafortunadamente, a pesar de la importancia de este nuevo concepto, gran parte de la evidencia sobre la contribución de las bacterias a la infectividad de estos virus se ha obtenido en modelos celulares y animales. Se han descrito correlaciones entre la abundancia de varios taxones bacterianos y la disminución de los títulos de anticuerpos contra RV y NoV en adultos¹⁴², pero los datos de infecciones en el grupo más relevante de niños aún son escasos y, en el caso de RV, se derivan principalmente de los resultados de seroconversión después de la vacunación^{134,135,137}. En este trabajo intentamos llenar esta brecha, mediante la utilización de muestras clínicas de niños con diarrea aguda debida a la infección por las cepas de RV y NoV más relevantes en la actualidad (G1P[8] y GII.4 Sydney 2012, respectivamente).

En muestras de heces provenientes de niños con GEA por RV, hemos identificado a dos géneros bacterianos, *Ruminococcus* y *Oxalobacter*, que interactúan con el virus durante la infección (Figura 16). Sin embargo, los resultados de la secuenciación del ANDr 16S mostró una variabilidad significativa entre muestras, influenciada principalmente por diferencias individuales. Esta variabilidad es posiblemente consecuencia de una limitación metodológica causada por la técnica utilizada para aislar las bacterias (FACS). No todas las muestras de heces son iguales y el umbral usado para discriminar entre fluorescentes y no fluorescentes fue el mismo para las 5 muestras de heces. Sin embargo, el descubrimiento de una interacción entre *Ruminococcus* spp. y RV coincidió con el hallazgo en estudios previos de que los niveles intestinales de *Ruminococcus* spp. correlacionaron negativamente con los títulos de IgA contra RV¹⁴², lo que nos llevó a seleccionar a este género para caracterizar su relación con la infección por este virus.

IX. DISCUSIÓN

Una objeción que se podría plantear contra la idea de que las bacterias intestinales regulan la infectividad de RV, está relacionada con la diferente compartimentalización de su replicación y la ubicación de la microbiota intestinal. Se sabe que la microbiota intestinal reside principalmente en el colon, mientras que la replicación de RV ocurre en el intestino delgado¹², donde el número y la diversidad bacteriana es mucho menor en comparación con el intestino grueso²⁰⁷. Las bacterias de los géneros *Ruminococcus* y *Oxalobacter* son estrictamente anaeróbicas, están asociadas con el tracto intestinal de los mamíferos y se pueden aislar de las heces humanas, lo que indica un hábitat colónico^{208,209}. Se ha asociado a las especies del género *Ruminococcus* con la importante función de degradar el almidón resistente de los alimentos^{210,211} y son importantes en la maduración de la microbiota intestinal durante el desarrollo humano²¹². Sin embargo, *Ruminococcus* spp. también reside en el intestino delgado y la vesícula biliar, ya que se ha aislado de la bilis¹⁸⁵.

Como se mencionó anteriormente, los miembros de la microbiota pueden contribuir a la protección contra los virus entéricos de diferentes formas. Una de ellas es a través de la unión directa de partículas de RV a bacterias, como se ha sugerido en el caso del probiótico *E. coli* Nissle⁹⁶ y la bacteria filamentosa segmentada *C. arthromitus*¹⁰⁰. Estas interacciones pueden ser facilitadas por moléculas similares a HBGAs que se encuentran en las superficies bacterianas. En este estudio demostramos la unión de RV G1P[8] en la superficie de *R. gausvreauii* (Figura 17). Esta unión puede ser la base para el efecto inhibitorio de *R. gausvreauii* sobre la infectividad *in vitro* de la cepa Wa de RV. Se ha demostrado previamente que bacterias entéricas como *E. cloacae* expresan antígenos similares a A, B y H en su superficie y pueden unirse a HuNoV¹⁰⁹. En nuestro ensayo, detectamos el mismo patrón de antígenos en la superficie tanto de *E. cloacae* como de *R. gausvreauii* (A, B, H y Le^a) (Figura 18). Se ha descrito que RV P[8], el genotipo P más frecuente, interactúa con el antígeno H tipo 1 y con el antígeno A, mientras que los antígenos Lewis no encajan en el sitio de unión determinado para estos antígenos⁴⁹. La unión al antígeno H y al antígeno A podría proporcionar un mecanismo mediante el cual RV se adhiere a la superficie de *R. gausvreauii*, lo que sugiere que la adhesión virus-bacteria podría producir la captura de virus y disminuir así la infectividad viral, tal y como muestran nuestros resultados *in vitro* (Figura 19B). Experimentos previos

IX. DISCUSIÓN

han demostrado una reducción en la infectividad de RV Wa en una configuración similar a la descrita aquí, como, por ejemplo, *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp.^{213,214} o la infección de RV bovino en células cultivadas²¹⁵. Recientemente se ha demostrado que la infección crónica por RV, que se produce en ratones inmunocomprometidos que carecen de células B y T (ratones Rag1-KO), puede prevenirse mediante la colonización ileal por *C. arthromitus*¹⁰⁰. Este efecto protector no implica mecanismos inmunorreguladores desencadenados por esta bacteria, sino que probablemente depende de dos mecanismos no excluyentes mutuamente: la reducción directa de la infectividad de RV como resultado del contacto con estas bacterias y el aumento de la renovación de los enterocitos.

Actualmente no se sabe si los altos niveles de *Ruminococcus* spp. representan un factor de protección contra la infección por RV en los niños. De hecho, las muestras en las que se detectó a *Ruminococcus* spp. provenían de niños que padecían diarrea. Sin embargo, este género se encuentra con frecuencia en las heces de niños sanos menores de 5 años²¹⁶. En un estudio reciente, se comparó la microbiota de las heces de niños con diarrea por RV y la de niños sanos, y se encontró que el género *Ruminococcus* era significativamente más abundante en los niños sanos, lo que refuerza la idea de un posible papel antiviral de este género bacteriano²¹⁷ y confirma tanto nuestros resultados de infección *in vitro* como los resultados anteriores de correlación entre RV y la microbiota en humanos¹⁴².

Revisando la bibliografía actual, nos damos cuenta de que se necesitan más estudios para desentrañar la contribución de taxones específicos de la microbiota a la infección por RV en humanos. Algunos trabajos han señalado la relevancia de la composición de la microbiota intestinal en la falta de eficacia (baja respuesta a la vacuna) de las vacunas contra RV en entornos sociales de bajos y medianos ingresos^{134,135,137}, pero este problema está lejos de resolverse y se han planteado otros posibles factores contribuyentes, como la coinfección con otros virus intestinales y la respuesta inmune desencadenada²¹⁸. Sin embargo, el par bacteria-RV que se informa aquí parece ser biológicamente relevante, ya que la interacción se detectó en infecciones naturales y

IX. DISCUSIÓN

previamente se evidenció una correlación entre la abundancia de *Ruminococcus* spp. y la susceptibilidad a la infección por RV en muestras humanas¹⁴².

De forma similar, tras los resultados obtenidos en el estudio anterior, se analizaron muestras de heces de 9 niños diagnosticados de GEA causada por NoV GII.4 Sydney 2012 con la intención de identificar los géneros bacterianos que interactúan con este virus en el intestino humano. Conocidas las limitaciones metodológicas del estudio con RV, en este caso decidimos realizar la separación bacteriana mediante la técnica de inmunoprecipitación con partículas magnéticas. Se separaron cuatro grupos de poblaciones de bacterias: bacterias totales (T), bacterias reconocidas por el anticuerpo de control de isotipo IgG (C), bacterias no reconocidas por ningún anticuerpo (ni el control de isotipo IgG ni el específico) (N) y bacterias reconocidas por el anticuerpo anti-VLPs GII.4 Sydney 2012 (NoV). Mediante esta técnica logramos identificar a *Allobaculum* y *Rhodococcus* como géneros que unen específicamente NoV GII.4 Sydney 2012 (Figura 21), aunque sólo *Rhodococcus* spp. presentó diferencias significativas entre el grupo NoV y el resto de los tratamientos. El hallazgo de este género como grupo principal que une NoV nos impulsó a caracterizar esta interacción, ya que no se había informado previamente sobre su relación con HuNoV.

Rhodococcus es un género de bacterias Gram positivas y aerobias ampliamente distribuidas en la naturaleza. Pertenecce a la familia *Corynebacteriaceae* y está relacionada con los géneros *Mycobacterium* y *Corynebacterium*, miembros pertenecientes al mismo filo (*Actinomycetota*). Estas bacterias han sido aisladas del suelo, del agua y de diversos organismos vivos. Algunas especies del género *Rhodococcus* se sabe que son patógenas, como *R. hoagii* (anteriormente *R. equi*), que causa infecciones zoonóticas, y el fitopatógeno *R. fascians*²¹⁹. En la última década, los rodococos han despertado un considerable interés debido a sus altas propiedades catabólicas. Estas bacterias son capaces de degradar diversos contaminantes (hidrocarburos poliaromáticos, dioxinas, bifenilos policlorados tipo dioxina, etc.) y, por lo tanto, pueden emplearse para la biorremediación de suelos²²⁰.

Curiosamente, y posterior a nuestros hallazgos, en un estudio realizado con niños inmunocomprometidos infectados por NoV se observó una diferencia en la composición

IX. DISCUSIÓN

bacteriana respecto a la de niños inmunocompetentes. En sus resultados observaron que la microbiota de los niños inmunocomprometidos presentaba un aumento, entre otros taxones, en la abundancia de miembros de la familia *Corynebacteriaceae*, entre los que se encontraba *Rhodococcus* spp.²²¹. En nuestros resultados, mostramos cómo las cinco especies seleccionadas de *Rhodococcus* spp. unieron fuertemente las VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 (Figura 22A). Además, cuando se analizó mediante microscopía electrónica la unión de las VLPs a la cepa *R. rhodochrous*, nos sorprendió observar la formación de agregados de partículas virales englobadas en una especie de mucosidad alrededor de la superficie bacteriana (Figura 22B). De hecho, *Rhodococcus* spp. ha sido relacionado con el género *Mycobacterium* debido al alto contenido de ácidos micólicos en su superficie²²². Además, estudios más recientes han permitido caracterizar la composición del EPS de algunas cepas del género *Rhodococcus*^{223–225}, y han determinado que el EPS está compuesto por glucosa, galactosa, fucosa, manosa y ácido glucurónico. Esta mezcla de azúcares también se halla en los HBGAs. En nuestro estudio, las 5 cepas mostraron un reconocimiento elevado por los anticuerpos anti-HBGAs de tipo A y B y, en menor medida, por los anticuerpos anti-H y anti-Le^y (Figura 23), todos pertenecientes a la vía secretora (ver Figura 5, apartado 2.3 de Introducción). Aunque no hay consenso entre el patrón de reconocimiento de NoV GII.4 Sydney 2012 y los HBGAs⁵³, en nuestro ensayo, las VLPs mostraron una unión intensa al azúcar de tipo B y más débil al Le^x (Figura 24). En un estudio con el EPS purificado de *Enterobacter* sp. SENG-6, se determinó que las VLPs de NoV GI.1 (reconocen el tipo A y H)^{30,52} se unían al azúcar de tipo A presente en el EPS de esta bacteria. Cuando eliminaron el residuo terminal de N-acetilgalactosamina (presente en el antígeno A), la unión se debilitó¹⁰⁹. Aunque no se pueden descartar otros componentes de la superficie de *Rhodococcus* spp., es posible que la presencia del grupo sanguíneo B en la estructura del EPS facilite su interacción con partículas de NoV GII. 4 Sydney 2012.

De manera similar al estudio realizado por Rubio-del-Campo *et al.*, con partículas P de NoV GI.1¹⁰² y dos probióticos (*L. casei* y *E. coli* Nissle), nos propusimos evaluar el efecto de la presencia de la especie tipo *R. rhodochrous* sobre la adhesión de las VLPs de NoV GII.4 Sydney 2012 a células HT-29M6 (Figura 25). Sorprendentemente, y al contrario de los resultados obtenidos en el estudio de partículas P¹⁰², la presencia previa (ensayo

IX. DISCUSIÓN

de desplazamiento) o posterior (ensayo de exclusión) de las bacterias en el cultivo celular disminuyó la adhesión de las VLPs. Sin embargo, cuando se añadieron a las células la mezcla de VLPs y bacterias, se produjo un aumento en un 674 % de la adhesión de las VLPs a las células (OD₆₀₀ 1). La explicación entre las diferencias de adhesión de las VLPs según el momento de incorporación de las bacterias posiblemente se deba a la diferente estabilidad de la unión sobre la monocapa celular. Cuando las bacterias se añaden antes o después de las VLPs, observamos una disminución gradual en la adhesión conforme aumentamos la concentración de bacterias. Posiblemente, la mayor concentración de bacterias hace que, en el proceso de lavado, arrastre mayor cantidad de VLPs. Por el contrario, al co-incubar previamente las VLPs con las bacterias (simulando una situación ocurrida en el lumen intestinal), la mayor concentración de bacterias da lugar a la formación de una mezcla de agregados (bacterias y VLPs), con la generación de una especie de flóculo, tal y como vemos en la imagen de microscopia electrónica (Figura 22B). En un estudio reciente observaron cómo los ácidos biliares hidrofóbicos inducen la acumulación de partículas virales en las proximidades de las células, agrupando los viriones y permitiendo la unión directa y eficiente a las células diana²²⁶. En nuestro caso, esta circunstancia podría aumentar la estabilización de la estructura de las pseudopartículas virales, de forma similar a los ácidos biliares, favoreciendo la mayor interacción con la mucosa de la monocapa celular. Nuestros resultados también están en consonancia con los obtenidos por Robinson *et al.*, quienes observaron que el LPS bacteriano favoreció la estabilidad de la estructura de poliovirus y promovió su unión a la superficie de las células diana¹¹⁶. Estos resultados sugieren que la interacción de *Rhodococcus* spp. con NoV en el ambiente podría favorecer su resistencia y transmisión, al aumentar la estabilidad de su estructura.

Aunque hemos comprobado el efecto de esta bacteria sobre la adhesión de NoV a las células, no sabemos qué influencia podría tener sobre la infección por este virus, pero posiblemente implique a la composición de azúcares presentes en su EPS, tal y como se ha demostrado para otros virus. En un estudio con el virus de la influenza se demostró que un componente de la superficie de *R. equi* (fosfatidilinositol, que porta un ácido graso de cadena ramificada) se une a la hemaglutinina del virus y bloquea la infección de células MDCK (células de riñón canino de Madin-Darby)²²⁷. De forma similar, otros

IX. DISCUSIÓN

autores observaron cierta protección en ratones a la infección por el virus de la influenza A/Osaka/5/70 (H3N2), cuando administraron Rt. GM-2, un glicolípido que contiene ácido micólico aislado del EPS de *R. terrae*²²⁸. Esposito *et al.* identificaron una fracción bioactiva en el EPS de *Rhodococcus* sp. I2R que contenía más de 30 glicolípidos con grupos funcionales inusuales. La fracción activa mostró un potente efecto antiviral frente al virus del herpes simplex 1²²⁹. También se le ha asociado una actividad anticancerígena al EPS de estas bacterias. Este mismo grupo demostró que esta fracción bioactiva ofrecía una alta actividad antiproliferativa en la línea celular de cáncer de próstata PC3²²⁹. En otro estudio se evaluó la actividad anticancerígena *in vitro* del EPS purificado de *R. erythropolis* HX-2 en células normales L929, células A549 (adenocarcinoma de pulmón), células SMMC-7721 (cáncer de hígado) y células Hela (cáncer de cérvix). El EPS inhibió el crecimiento de las células cancerígenas en una concentración determinada sin dañar las células normales²²⁵.

Como vemos, este género es muy versátil, pues se ha demostrado que su EPS puede tener aplicaciones en la industria alimentaria (por su elevada viscosidad)²²⁵, farmacéutica (efecto antiviral) y medioambiental (biorremediación). Haría falta realizar más experimentos relacionados con la interacción con NoV con el objetivo de añadir nuevas utilidades a este género como potencial antiviral frente a virus entéricos (postbiótico) y como posible aplicación para el tratamiento de aguas contaminadas con este patógeno.

Por tanto, nuestros resultados sobre bacterias que unen virus en muestras clínicas aportan nuevos datos sobre la interacción entre las bacterias y los virus entéricos durante el proceso de la infección y podrían abrir nuevas vías para explorar estrategias innovadoras para prevenir y tratar las infecciones por RV y NoV.

Hasta la década de 2010, en términos generales, no se había considerado la posible influencia de la microbiota sobre la susceptibilidad a las infecciones causadas por patógenos entéricos virales²³⁰. Fue a partir de 2010 cuando los investigadores comenzaron a explorar su impacto en las infecciones por virus entéricos como NoV, RV, poliovirus y reovirus, sugiriendo un efecto directo, tanto positivo como negativo, en la susceptibilidad del huésped a estas infecciones^{100,110,111,116,117,231}. Esta investigación

IX. DISCUSIÓN

pretende aportar datos nuevos sobre el papel de la microbiota en la susceptibilidad a la infección por virus humanos. Para ello, se utilizó el modelo de ratón y las cepas de RV y NoV más representativas. La cepa de RV elegida para este experimento (Wa) se ha utilizado como modelo para estudios de HRV y es especialmente relevante porque pertenece al genotipo P[8] que, junto a la cepa GII.4 Sydney 2012 de NoV, son responsables de la mayoría de las infecciones gastrointestinales a nivel mundial^{27,64}.

Con el objetivo de determinar si los tratamientos se realizaron de forma correcta, analizamos, por un lado, el perfil de microbiota establecido en cada grupo y, por otro, cuantificamos el número de bacterias totales antes de la infección. Como era de esperar, nuestros resultados mostraron una separación clara en la composición microbiana de cada uno de los grupos de ratones (Figuras 26 y 34) y, además, comprobamos que el tratamiento con antibióticos disminuyó el número total de bacterias respecto al grupo Control. En ambos experimentos (infección con RV y con NoV), los ratones mantenidos con antibióticos (grupo Ab) mostraron diferencias significativas respecto al resto de grupos (Figuras 29 y 37). Tras realizar el trasplante de microbiota, los grupos self-FMT (autotrasplante de microbiota) y hFMT (trasplante de microbiota humana) restauraron parcialmente su cantidad de bacterias, aunque no llegaron a los niveles del grupo Control. A su vez, el análisis de cuantificación del número de bacterias totales nos permitió evaluar si la abundancia total de bacterias podría afectar a la infección, independientemente del tipo de microbiota. En el análisis de correlación entre el número de bacterias totales (medido como GCE del ADNr 16S/g de heces) y el título viral, los resultados mostraron que la disminución en la abundancia bacteriana correlacionó moderadamente con mayores niveles de virus detectados en las heces, siendo más significativo para NoV.

Teniendo en cuenta que existe una coevolución entre la microbiota y el hospedador, y que los virus se adaptan a este nicho para poder subsistir, nos planteamos la hipótesis de que, en el modelo de ratón, la infección con virus humanos podría ser restaurada mediante el trasplante con microbiota humana. El hecho de que, hasta la fecha, no exista un modelo de ratón eficiente para replicar cepas relevantes de HRV y HuNoV^{232,233} y que la diarrea por GEA afecte principalmente a niños menores de 5

IX. DISCUSIÓN

años^{6,234}, nos alentó a investigar si los ratones podían ser infectados con estos virus después de la implantación de la microbiota intestinal de lactantes sanos.

Independientemente del trasplante, al analizar la carga viral a lo largo de los 7 dpi, se observó que el grupo Ab infectado con RV exhibió los niveles más elevados y una mayor duración de la excreción viral (Figura 28). Al examinar la influencia de la microbiota humana en la infección, nuestros resultados mostraron que el grupo hFMT presentó un nivel y duración de excreción viral similar al del grupo Ab, sugiriendo una mejora en la infección respecto al grupo con microbiota murina. Estos resultados están en discrepancia con los obtenidos con la cepa EC (un rotavirus de origen murino), ya que con ella el tratamiento con antibióticos tuvo efectos negativos en la entrada viral, retrasando y disminuyendo la infectividad tanto en el modelo murino adulto (reducción del 40 % en la eliminación viral) como en el neonatal (reducción del 34 % en la incidencia de diarrea)¹¹⁷. Sin embargo, investigaciones recientes también señalan un papel protector de la microbiota durante la infección por otro rotavirus de origen murino (cepa EDIM), al demostrar una alta susceptibilidad a la infección en animales tratados con antibióticos y libres de microorganismos⁹⁹, del mismo modo que en nuestros resultados con RV Wa. Además, en respaldo a nuestros hallazgos, en un ensayo clínico en adultos humanos con la cepa vacunal Rotarix® (del mismo genotipo que el utilizado en este estudio) se demostró que el tratamiento con antibióticos incrementó la excreción viral y, además, se observó una correlación con la abundancia de algunos grupos bacterianos¹³⁸.

Respecto a NoV, la bibliografía sobre el efecto de la microbiota en la infección por virus humanos es más escasa, posiblemente debido a la falta de modelos adecuados de cultivo celular²³⁵ y de animales de experimentación pequeños. En un estudio con el modelo murino demostraron un restablecimiento de la infección por la cepa CR6 (un NoV de origen murino) tras la restauración de la microbiota bacteriana, en comparación a los ratones tratados con antibióticos¹²⁷. Del mismo modo, en el modelo porcino, los cerdos trasplantados con microbiota humana presentaron una duración prolongada de la excreción y una mayor carga viral de HuNoV GII.4 (variante 2006b) que los cerdos libres de microorganismos¹¹⁹. En nuestros resultados, al contrario que en los ejemplos anteriores, observamos que el grupo tratado con antibióticos presentó el nivel más alto

IX. DISCUSIÓN

de excreción viral, y este fenómeno se mantuvo durante un período más prolongado que en los otros grupos (Figura 36). En contraste con los ratones infectados con RV, el grupo hFMT mostró una menor excreción en comparación con el grupo que recibió antibióticos (grupo Ab), pero superó a los ratones con microbiota murina en términos de los niveles de excreción viral

Las discrepancias halladas en la bibliografía podrían ser resultado de diferentes factores. Se ha discutido que las variaciones en el microbioma de los animales experimentales en diferentes laboratorios pueden afectar a los fenotipos de los animales, lo que puede causar problemas de reproducibilidad²³⁶. Además, se debe tener en cuenta la utilización de modelos de estudio diferentes, como el uso de virus específicos de cada animal, cepas diferentes y diseños experimentales distintos al empleado en este proyecto. Esta situación tendría efectos menores en nuestro caso, ya que demostramos que el simple hecho de eliminar la microbiota con antibióticos permitió la replicación de RV Wa y una mayor excreción de NoV GII.4 Sydney 2012 P[16] en el modelo de ratón.

Es importante mencionar que una de las limitaciones de este estudio ha sido el poder relacionar los mayores niveles de virus detectados con el término “replicación”, ya que no pudimos visualizar directamente los virus en el intestino delgado de los ratones. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, en el caso de RV, la cantidad de virus utilizada como inóculo fue de $1,6 \times 10^{10}$ GCE y encontramos valores de $2,1 \times 10^{11}$ GCE/g y $1,5 \times 10^{11}$ GCE/g de heces en el grupo Ab y hFMT en el dpi 2 (Figura 28), respectivamente, por lo que podemos concluir que, en este caso, hubo replicación. Respecto a NoV, los ratones fueron inoculados con $1,8 \times 10^7$ GCE y la máxima cantidad hallada fue de $1,8 \times 10^6$ GCE/g en las heces del grupo Ab del dpi 2 (Figura 36). Aunque encontremos una disminución de un orden respecto al inóculo inicial, no sabemos cuánta cantidad del inóculo correspondía a virus infectivos. Aunque en este caso no podamos hablar de “replicación”, sí se puede concluir que el tratamiento con antibióticos aumentó el título de excreción viral en este grupo en comparación al grupo Control y, además, se observó una mayor duración del tiempo de excreción viral.

IX. DISCUSIÓN

Por tanto, nuestros resultados revelaron que la simple disminución de las bacterias intestinales mediante el tratamiento con antibióticos aumentó tanto el título viral detectado en las heces (replicación en el caso de RV) como la duración de la excreción de virus en este hospedador. Estos resultados proporcionan un nuevo modelo de ratón inmunocompetente que permite el estudio de las interacciones entre los genotipos más relevantes de HRV y HuNoV y el hospedador, superando la brecha de ausencia de modelos de animales pequeños. Regresando a la pregunta de si la microbiota humana podría favorecer la infección de ratones con virus humanos, nos sorprendió descubrir que existen diferencias dependiendo del virus, lo que confirma que la microbiota humana tiene un efecto diferente sobre la biología de RV y NoV.

Se sabe que una microbiota intestinal saludable se caracteriza por su alta diversidad de especies, su capacidad para resistir perturbaciones y su habilidad para recuperarse después de una alteración, lo que afecta a su vez a la susceptibilidad del hospedador a la infección por diferentes agentes patógenos⁷⁵, incluidos RV y NoV. Tras los tratamientos (antes de la infección) analizamos la diversidad de la comunidad bacteriana establecida en cada uno de los grupos de ratones. Los resultados muestran, como cabía esperar, que el tratamiento con antibióticos disminuyó la diversidad microbiana de manera considerable (Figuras 30 y 38), afectando tanto a la riqueza (número de taxones diferentes) como a la uniformidad de la distribución de la composición microbiana. En resumen, pudimos constatar que la menor concentración bacteriana y el menor índice de diversidad alfa característicos del grupo Ab se asociaron con niveles virales más elevados detectados en las heces de los ratones infectados por cada uno de los virus.

Una vez comprobada la influencia de la abundancia total y de la diversidad microbiana sobre la susceptibilidad de los ratones a la infección viral, quisimos comprobar si la remodelación del perfil microbiano podría influir sobre la mayor o menor excreción viral. Cuando analizamos los biomarcadores bacterianos de cada grupo de ratones y los relacionamos con el título viral, nuestros resultados mostraron que los géneros *Oscillospira*, *Lactobacillus*, *Akkermansia*, *Allobaculum*, *Adlercreutzia*, *Odoribacter*, *Streptococcus*, *Ruminococcus* y *Bifidobacterium*, presentes en mayor

IX. DISCUSIÓN

proporción en la microbiota de los ratones Control, correlacionaron negativamente y de forma moderada con la replicación de RV Wa (Figura 32), lo que sugiere que estos taxones, propios de la microbiota murina, podrían actuar como factores restrictivos de la infección por este virus. *Oscillospira* es un género anaerobio presente en el tracto gastrointestinal y, aunque nunca se ha cultivado, hay evidencia que indica su relevancia para la salud humana²³⁷. Los lactobacilos son bacterias probióticas conocidas que disminuyen la diarrea inducida por RV en humanos²³⁸ y reducen la infección tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*^{215,239}. *Ruminococcus* spp. prácticamente desapareció después de la administración de antibióticos (lo que muestra una mayor sensibilidad a este tratamiento) y se ha correlacionado con bajos títulos de IgA anti-RV en la saliva humana de sujetos sanos¹⁴². Además, recordemos que, en nuestro ensayo de interacción con RV, redujo la infectividad de RV Wa en cultivos de células Caco-2. *Bifidobacterium*, otro género relevante de bacterias probióticas con propiedades anti-RV comprobadas^{239,240}, también fue erradicado por los antibióticos.

Tras cualquier perturbación en el ecosistema intestinal, como por ejemplo el tratamiento con antibióticos, ciertos miembros de la microbiota comensal (patobiontes), que normalmente están presentes en cantidades bajas, pueden proliferar debido a las condiciones favorables creadas. En nuestro estudio con RV, hallamos que los géneros *Lactococcus*, *Proteus* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae* correlacionaron positivamente con la replicación de RV Wa (Figura 32), resultando como grupos permisivos de la infección de este virus. Las especies de *Proteus* son consideradas patobiontes y se ha observado que son muy abundantes durante la inflamación del intestino^{124,125}. En huéspedes desnutridos, se ha encontrado que una mayor abundancia de *Proteus* spp. se relaciona con inflamación intestinal, desequilibrio en la composición de la microbiota (disbiosis) y un mayor riesgo de infecciones sistémicas^{125,126}. En un estudio realizado con cerdos gnotobióticos, que fueron trasplantados con heces humanas y posteriormente infectados con la cepa vacunal Rotarix® (G1P[8]), se observó que los cerdos alimentados con una dieta baja en proteínas, lo que lleva a una alteración del perfil microbiano, exhibieron niveles más altos de liberación viral en las heces en comparación con los cerdos que recibieron una dieta normal. Además, de manera interesante, los cerdos con dieta baja en proteínas mostraron una mayor presencia de

IX. DISCUSIÓN

Proteus spp. en su intestino siete días después de la infección¹²³. En otro estudio con humanos, se encontró que los niños que respondieron a la vacuna (relacionado con una mayor infección y activación del sistema inmune adaptativo) presentaron una relación Enterobacterias/*Bacteroidota* significativamente mayor en comparación con los no respondedores, de manera similar a los resultados de este estudio. En cuanto a la relación entre el género *Lactococcus* y la infección por RV, sólo en un estudio evaluaron el efecto de la especie *L. lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 (LC-Plasma) sobre la infección de ratones con RV rhesus. En contra de nuestros resultados, los ratones inoculados con LC-Plasma mostraron una disminución del título de RV en las heces en comparación con los ratones control²⁴¹. Sin embargo, debemos tener en cuenta que no sabemos qué especies del género *Lactococcus* están presentes en nuestros ratones y, además, tanto la cepa viral como los ratones (BALB/c) son diferentes en ambos estudios. La mayoría de la bibliografía científica respecto a la relación de *Lactococcus* spp. y RV se ha basado en el efecto de esta bacteria como un posible coadyuvante vacunal mediante su uso como sistema de expresión de las proteínas NSP4, VP4, VP6 y VP7 de RV, debido a la mayor inmunogenicidad mostrada en experimentos *in vitro* y con ratones^{242–248}. En alguno de estos estudios, cuando evaluaron la presentación de antígenos de manera intracelular o extracelular (anclados a la pared de la bacteria), mostraron mayores niveles de anticuerpos anti-RV cuando el antígeno se presentaba de forma extracelular. Además, en un estudio con una cepa bovina (NCDV), mostraron una unión a *L. lactis*, mayor a la de otras bacterias probióticas²⁴⁹. Estos resultados podrían apoyar los datos obtenidos en nuestro estudio ya que la presencia de *Lactococcus* spp. podría favorecer la infección mediante la aproximación de las partículas virales a las células diana por su unión al peptidoglicano de la bacteria.

En el caso de NoV, sólo los géneros *Chryseobacterium*, *Sphingomonas* y, de nuevo, *Lactococcus* fueron considerados como favorecedores de la posible replicación (Figura 40), mientras que ningún grupo taxonómico correlacionó negativamente con el título viral por lo que, en este caso, no hemos hallado ninguna bacteria asociada directamente con la restricción de la replicación de NoV GII.4 Sydney 2012 [P16]. Estos géneros pueden considerarse, al igual que en el caso de los géneros permisivos hallados en RV, como patobiontes, pues su abundancia aumentó tras la administración de antibióticos. De

IX. DISCUSIÓN

hecho, *Chryseobacterium* spp. se ha relacionado con la resistencia a aminoglucósidos y beta-lactámicos²⁵⁰, como algunos de los antibióticos administrados en este estudio (amoxicilina y neomicina). Por otro lado, y al igual que *Rhodococcus* spp., las bacterias del género *Sphingomonas* han sido utilizadas por su capacidad catabólica para la biorremediación de suelos contaminados con pesticidas^{251,252}. Sin embargo, no existe ninguna publicación acerca de la relación de los géneros *Chryseobacterium* y *Sphingomonas* con NoV, por lo que nuestros hallazgos amplían los conocimientos sobre posibles bacterias influyentes en la susceptibilidad a la infección por HuNoV. También, y al igual que con RV, la bibliografía acerca de la relación entre *Lactococcus* spp. y la infección por NoV es muy escasa. En un modelo de cultivo celular con calicivirus felino (FCV), la coincubación de *L. lactis* subsp. *lactis* LM0230 y el virus mostró una reducción del título viral²⁵³, lo que estaría en contraposición a nuestros datos. Sin embargo, cuando las bacterias estaban presentes antes de la inoculación viral, no se observó un efecto antiviral significativo. Por tanto, no podemos comparar los resultados de este estudio con los datos obtenidos en nuestros experimentos ya que la presencia de bacterias en nuestro estudio fue determinada antes de la infección y el diseño experimental es completamente diferente. Al igual que con RV, se ha demostrado la capacidad inmunogénica de *L. lactis* para su uso como un vector vacunal frente a NoV²⁵⁴. En este estudio, se construyó una cepa de *L. lactis* que portaba el gen VP1 de HuNoV GII.4 (LAB-VP1). Tras la inoculación con LAB-VP1 a cerdos gnotobióticos, detectaron IgG e IgA específicas de HuNoV en el suero y las heces, respectivamente, a partir de los 13 días después de la inoculación. Después de ser infectados con una cepa de HuNoV GII.4, el grupo control (inoculado previamente sólo con *L. lactis*) presentó una elevada cantidad de antígenos de HuNoV en las secciones del duodeno, yeyuno e íleon del intestino. En contraste, se detectaron significativamente menos (o ningún) antígeno de HuNoV en los grupos inmunizados previamente con LAB-VP1²⁵⁴. De nuevo, estos resultados nos muestran una consistencia con los datos obtenidos en nuestro estudio, en el cual, una mayor abundancia del género *Lactococcus* correlacionó con mayores títulos virales hallados en las heces (Figura 40). Además, la unión a la pared de las bacterias de *Lactococcus* spp., como se ha demostrado para las partículas P de NoV GI.1 y GII.4¹⁰², podría favorecer, al igual que con RV, la aproximación de NoV a las células diana. Por otro

IX. DISCUSIÓN

lado, aunque no correlacionaron directamente con el título viral, los lactobacilos, presentes en la microbiota del ratón, se han relacionado con un efecto anti-NoV en varios modelos de infección. Como ejemplos, *Lactobacillus rhamnosus* GG protegió a los cerdos gnotobióticos de la diarrea inducida por HuNoVs (cepa GII.4/2006b) y redujo la eliminación viral¹⁰³; también se caracterizó a otras bacterias probióticas por ser capaces de interactuar con partículas P y viriones de HuNoV^{102,103}, por lo que es posible que estas bacterias pudieran unir partículas virales y dificultar la aproximación a las células diana.

Se ha informado que, en la regulación de la infección viral, la microbiota comensal puede promover efectos inhibidores o favorecedores sobre la infectividad viral a través de diversos mecanismos^{84–88}. Además de los efectos directos que algunas bacterias específicas pueden tener en la estabilidad y viabilidad viral, afectando directamente a la infectividad¹¹⁶, está establecido que la microbiota intestinal es un fuerte modulador de la respuesta inmunológica. Una comunidad microbiana alterada, una vez establecida, afecta considerablemente al perfil de expresión génica de los moduladores inmunes, creando así un bucle de retroalimentación en el cual el sistema inmunitario del huésped y su microbiota se regulan mutuamente²⁵⁵. En este sentido, se ha confirmado la importancia de la microbiota en el establecimiento de una respuesta inmunitaria antiviral adecuada^{84,256}. Se ha demostrado que, en ratones con microbiota disminuida (vía administración de antibióticos), se produjo una infección sistémica exacerbada de varios virus (entéricos y no entéricos), incluyendo el virus de la estomatitis vesicular y de la influenza¹⁰⁷, el gammaherpesvirus murino²⁵⁷, el virus sincitial respiratorio¹⁰⁸, el virus de la encefalomiocarditis¹⁰⁶ y los virus del Nilo Occidental, del dengue y del Zika²⁵⁸, lo que se ha relacionado con fallos de la respuesta inmunitaria innata, dificultando la capacidad para generar una respuesta antiviral efectiva^{107,108}.

Considerando la posible influencia de la microbiota en la modulación de la respuesta inmunitaria antiviral, nos propusimos examinar la expresión de diversos componentes del sistema inmunológico innato. Es relevante destacar que, por consideraciones éticas (evitar la eutanasia de un mayor número de animales), no pudimos evaluar la expresión en diferentes momentos del estudio. Por lo tanto, los datos

IX. DISCUSIÓN

que recopilamos sobre la expresión de los componentes inmunológicos corresponden a los 7 días de la infección, lo que significa que están influenciados tanto por el tratamiento recibido como por la infección viral.

En el experimento de ratones infectados por RV, en general, la administración de antibióticos (grupos Ab, self-FMT y hFMT) provocó una disminución de los mediadores proinflamatorios, lo que se relacionó, al igual que los ejemplos anteriores, con un mayor título viral (Figura 33). Nuestros resultados mostraron una reducción significativa en la expresión de *Il10*, *Tnfa* y *Tlr2* en todos los grupos tratados. Además, el análisis de correlación indicó que su menor expresión se asoció significativamente y de forma moderada con la replicación. Estos son mediadores importantes de la respuesta inmunitaria a las infecciones virales, incluyendo RV, cuya respuesta normal corresponde a un aumento de la expresión después de la infección^{96,259}. En cuanto a los niveles de expresión de *Il1β* y *Cxcl15* (*IL8*), éstos fueron más bajos en los grupos Ab y hFMT, en los que RV replicó de manera más eficiente, estando *Il1β* fuertemente asociada de forma negativa con un mayor nivel de replicación. Se sabe que esta citocina desempeña un papel importante en la respuesta inflamatoria temprana contra patógenos y se ha descrito que su nivel también aumenta durante la infección por RV en niños²⁶⁰. Como vemos, en general, la replicación de RV en este modelo animal se vio favorecida por una disminución de los mediadores proinflamatorios, de la misma manera que se ha encontrado con la cepa murina EDIM, con la que observaron una disminución de IL22 cuando los ratones fueron tratados con antibióticos⁹⁹. Por otro lado, podría resultarnos contradictorio observar una disminución de la expresión génica de la citocina antiinflamatoria IL10. Sin embargo, se debe tener en cuenta que esta citocina contribuye a la regulación de la respuesta inmunológica y ayuda a mantener la homeostasis del sistema inmunitario al participar, entre otras funciones, en la resolución de la inflamación y la restauración del equilibrio inmunológico después de la infección viral²⁶¹. En el grupo Control, en el que la microbiota no se vio alterada inicialmente, los niveles de esta citocina fueron mayores, lo que posiblemente contribuyó a una regulación inmunológica favorable.

IX. DISCUSIÓN

Respecto a NoV, los resultados obtenidos mostraron diferencias en algunos de los componentes inmunes analizados. Los tres grupos de ratones tratados con antibióticos presentaron diferencias en la expresión de *Il4*, *Tnfa* y *Tlr2* (Figura 41). De nuevo, la expresión de *Tnfa* y *Tlr2* se redujo en este experimento y correlacionaron negativamente con el título viral. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos de pacientes inmunocomprometidos, ya que la respuesta inmune reducida característica de estos pacientes ha sido relacionada con la infección crónica de NoV^{221,262–264}. Sin embargo, nos sorprendió encontrar que la expresión de *Il4* (antiinflamatoria) aumentó considerablemente en los grupos tratados con antibióticos (siendo ligeramente superior en el grupo con mayor excreción viral) y, además, correlacionó positivamente con un mayor nivel de virus en las heces. Como se ha comentado anteriormente, una de las limitaciones fue la imposibilidad de medir la expresión en diferentes momentos de la infección. Si analizamos en detalle la curva de excreción de cada virus (Figuras 28 y 26), podemos observar una diferencia respecto al tiempo máximo de liberación viral. RV se detectó hasta el día previo a la medición (6 dpi) mientras que NoV dejó de detectarse el día 4 dpi. Desconocemos la cinética de la expresión de las citocinas proinflamatorias, pero es posible que, en el momento del análisis (7 dpi), se estuvieran activando los mecanismos antiinflamatorios, así como la respuesta inmune adaptativa (respuesta Th2) característica de IL4. Por lo tanto, aunque nuestros resultados sugerirían que un entorno antiinflamatorio podría favorecer la replicación de HuNoV en ratones con microbiota alterada, la limitación mencionada previene la confirmación definitiva de este hallazgo. No obstante, a pesar de que tampoco logramos confirmar la replicación de NoV (debido al menor número de copias genómicas detectadas en comparación con el inóculo), el aumento en los niveles de *Il4* (con la consiguiente activación de la respuesta Th2) nos alerta sobre la posibilidad de que la infección sí haya ocurrido efectivamente.

Otra cuestión para tener en cuenta es que RV, como ya sabemos, afecta principalmente a niños menores de 5 años, mientras que NoV infecta a personas de todos los grupos etarios. El modelo animal seleccionado corresponde a ratones de 6 semanas de edad por lo que, teniendo en cuenta que a nivel fisiológico hay una relación de edad de 1/30 respecto a los humanos²⁶⁵, su sistema inmune refleja un punto de desarrollo temprano. Nuestros resultados mostraron una eliminación viral más

IX. DISCUSIÓN

prolongada en el caso de RV, probablemente influenciada, entre otros factores, por la presencia de un sistema inmunitario intestinal inmaduro y/o alterado, característico de niños pequeños y personas de edad avanzada, respectivamente²⁶⁶. Por tanto, esto podría aportar una explicación a las diferencias halladas en la cinética de replicación, en el nivel de excreción del grupo hFMT (trasplantado con microbiota de lactantes) y en la respuesta inmune innata de cada virus.

Cuando evaluamos los posibles mecanismos inhibidores/favorecedores de las bacterias sobre la infección de RV, concluimos que todas ellas, a excepción del género *Akkermansia*, pudieron influir sobre la infección directamente a través de la modulación del sistema inmune (Tabla 12). En nuestros resultados, la mayoría de los géneros restrictivos de la infección correlacionaron positivamente con los mediadores proinflamatorios, mientras que los géneros favorecedores lo hicieron de manera negativa. Recordemos que la expresión de *Il1 β* se asoció de forma negativa y con mayor intensidad con la excreción viral (Figura 33B). Curiosamente, esta citocina correlacionó positivamente con todos los géneros considerados restrictivos de la infección (a excepción de *Akkermansia* spp.) y negativamente con los géneros favorecedores. En cuanto a los géneros permisivos, sólo las enterobacterias correlacionaron con todos los moduladores inmunes asociados a la infección. Recordemos que *Proteus* spp. fue el que correlacionó más intensamente con la replicación y que la mayor abundancia de este género correlacionó con la menor expresión de *Il1 β* y *Tnf α* . Sorprendentemente, en el estudio con cerdos gnotobióticos comentado anteriormente, donde la mayor abundancia de *Proteus* correlacionó con el mayor título viral, este género lo hizo fuertemente y de manera negativa, al igual que en nuestros resultados, con parámetros proinflamatorios (TNF α , IL17 e IL22)¹²³. En cuanto a *Lactococcus* spp., el hecho de que estas bacterias estuvieran presente en mayor proporción en todos los grupos de ratones, incluido el Control, podría explicar su menor efecto sobre los moduladores inmunes. Es posible que el efecto de *Lactococcus* spp. sobre la promoción de la infección de RV se deba principalmente a su interacción física con el virus²⁴⁹, tal y como se ha discutido anteriormente.

IX. DISCUSIÓN

Por último, todos los géneros restrictivos (a excepción de *Akkermansia*) y las enterobacterias (permisiva) tuvieron una correlación fuerte con la expresión de *Tlr2*, siendo positiva en el caso de las bacterias restrictivas. De hecho, TLR2 se ha relacionado con el efecto protector de los lactobacilos contra la infección por RV en modelos animales^{267,268}, lo que sugiere que, posiblemente, el tratamiento con antibióticos influyó indirectamente sobre su expresión, afectando a su vez a la infección viral. Otro aspecto que merece ser discutido es la expresión de *Infy*. Aunque en nuestros análisis no correlacionó con la infección, sí se vio disminuido tras la administración de antibióticos. En un estudio similar con la cepa murina EDIM, el tratamiento con antibióticos también facilitó la replicación del virus en ratones deficientes en los receptores de IFN tipo I y tipo III, revelando efectos provirales independientes de IFN en ratones con microbiota alterada. En nuestro caso, pudimos observar que los géneros restrictivos (a excepción de *Oscillospira* y *Akkermansia*) correlacionaron positivamente con *Infy* (tipo II). La administración oral de *Blautia coccoides* (un antiguo miembro del género *Ruminococcus*) en ratones tratados con antibióticos restableció la capacidad de los macrófagos para inducir *Ifnα* (tipo I) y promovió la protección contra la infección sistémica por el virus de la encefalomiелitis¹⁰⁶. Del mismo modo, los LOS de la membrana externa de *Bacteroides* spp. y el acetato derivado del metabolismo microbiano estuvieron involucrados en desencadenar una respuesta de IFNα que previno la infección en ratones por el virus de la estomatitis vesicular, por el virus de la influenza¹⁰⁷ y por el virus sincitial respiratorio²⁵⁶. Es posible que, de manera indirecta, la presencia de la microbiota murina (restrictiva de la infección) en los grupos Control y self-FMT colaborara con una mejor respuesta antiviral basada en INF (a parte del resto de moduladores).

Recordemos que en este estudio no se han encontrado taxones asociados directamente con la restricción de la infección por NoV. Cuando analizamos la correlación entre la abundancia de los géneros permisivos (*Chryseobacterium*, *Sphingomonas* y *Lactococcus*) y la respuesta inmune innata pudimos observar que los tres géneros correlacionaron negativamente con la expresión de *Tnfα* y *Tlr2* (Tabla 14), y de la misma manera con el título viral. Además, no tuvieron influencia sobre la expresión de *Il4*, lo que nos sugiere que esta citocina se vio modificada exclusivamente por la infección viral y no por la microbiota. Se sabe que la infección por diferentes virus

IX. DISCUSIÓN

entéricos, como NoV, da lugar, entre otros, al aumento de la expresión de *Tnfa*, lo cual lleva a la activación de la respuesta antiviral²⁶⁹. En nuestro estudio, la menor expresión de esta citocina favoreció la mayor excreción viral hallada en los ratones Ab, lo que se asociaría a un efecto modulado por la microbiota.

Aunque no se asociaron directamente con el título viral, pudimos observar que, en ambos experimentos (RV y NoV), los géneros propios de la microbiota murina correlacionaron positivamente con los moduladores proinflamatorios y negativamente con los antiinflamatorios, por lo que pudieron tener un efecto indirecto sobre la replicación viral (Tablas Ap1 y Ap2 del Apéndice). En el caso de RV, esta relación fue inversa para los géneros propios de la microbiota humana (*Erwinia*, *Megasphaera*, *Bacteroides* y *Parabacteroides*), explicando la reacción inmunológica frente a grupos bacterianos desconocidos por el hospedador. Además, la microbiota del ratón tuvo un menor efecto sobre la excreción de NoV a través de la respuesta inmunológica. Por otro lado, la expresión génica del receptor TLR2 correlacionó positivamente con todas las bacterias murinas mientras que lo hizo negativamente con las bacterias humanas. En general, se ha atribuido al LPS bacteriano intestinal la capacidad de activar de forma potente la respuesta inmune innata. Sin embargo, también se ha relacionado al LPS de determinadas especies de *Bacteroides* spp. con una disminución de la respuesta inflamatoria, entre las cuales se encuentra una menor expresión de *Tlr2*^{78–81}. Por tanto, aunque no de forma directa, la microbiota humana también pudo contribuir a la replicación de RV en el grupo hFMT, de manera inversa al resto de bacterias restrictivas propias del ratón.

Por último, es importante mencionar que no podemos descartar un posible efecto de los antibióticos sobre la expresión de componentes de la respuesta inmune^{270–273}. Teniendo en cuenta que se ha relacionado la presencia de microbiota con un efecto favorecedor de la infección por los virus Cocksackie y poliovirus, y que la administración de antibióticos en ratones reduce su infectividad, en un estudio quisieron determinar si los antibióticos tenían un efecto antiviral *per se* al afectar a la respuesta inmune innata y que fuera independiente de la presencia o no de bacterias intestinales. Observaron que, cuando infectaron ratones axénicos con estos virus, los antibióticos disminuyeron

IX. DISCUSIÓN

la infección viral a través de un mecanismo independiente de la microbiota²⁷⁴, de la misma forma que al infectar ratones no axénicos. Concluyeron que esta disminución en la infectividad podría deberse a la desregulación del sistema inmune mediada por los antibióticos. En nuestro caso, es posible que el tratamiento con antibióticos afectara indirectamente a la infección viral a través de la afectación de la respuesta inmune.

Se ha demostrado previamente que ciertos miembros específicos de la microbiota intestinal, como *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis* y las bacterias filamentosas segmentadas, pueden influir en el patrón de glicosilación mucosal al inducir la expresión de *Fut2* en las células epiteliales^{275,276}. Además, se ha determinado que, tras una infección sistémica producida en ratones, se produjo un aumento rápido de la fucosilación intestinal mediada por la microbiota, desencadenando a su vez el crecimiento de bacterias comensales beneficiosas y ayudando al mantenimiento de la simbiosis hospedador-microbiota⁷³. Cuando analizamos la relación entre la microbiota y la expresión de *Fut2*, sólo los ratones infectados con RV mostraron resultados significativos de correlación. En nuestros resultados, el género *Bacteroides* no se asoció con la expresión de *Fut2*. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la técnica de secuenciación no nos permitió discriminar a nivel de especie, por lo que no sabemos si las especies de este género presentes en la microbiota del ratón tienen la capacidad de influir sobre el estado de glicosilación. No obstante, sí encontramos que algunos de los géneros restrictivos de RV (y otros no asociados directamente a la replicación) correlacionaron con *Fut2* de manera positiva (Tabla 14). Curiosamente, *Akkermansia* spp. (restrictiva) y *Sutterella* spp. (no asociada a replicación) fueron las únicas que lo hicieron de manera negativa. Recordemos que el género *Akkermansia* no correlacionó con ninguno de los mediadores inmunes estudiados (Tabla 13) y es el más aumentado en el grupo self-FMT (Figura 27C). En este estudio, no es posible atribuir los efectos del estado de glicosilación a un género bacteriano específico. Sin embargo, se destaca que este género constituye el 41,5 % de la composición microbiana del grupo self-FMT y no muestra correlación con ningún componente del sistema inmunológico. A partir de esto, se plantea la hipótesis de que uno de los posibles mecanismos a través de los cuales esta bacteria limita la replicación de RV podría ser la modulación del estado de glicosilación en el epitelio.

IX. DISCUSIÓN

Ya hemos comentado que FUT2 es la enzima responsable de la síntesis del antígeno H. Según la bibliografía, este antígeno representa la diana de la unión de la proteína VP8* de RV P[8]⁴⁹ pero no de NoV GII.4 Sydney 2012⁵³. Inesperadamente, en nuestros análisis encontramos que el nivel de expresión de *Fut2* no correlacionó con el título viral de RV (Figura 33B), pero sí lo hizo de forma moderada y positiva con NoV (Figura 41B). Aunque no se obtuvieron diferencias significativas respecto a los ratones control, el grupo Ab de ambos experimentos mostró una tendencia negativa en el nivel de expresión de *Fut2*, lo que podría relacionarse con la disminución de la abundancia general de bacterias, tal y como muestra la bibliografía²⁷⁶. Aunque un estudio reciente ha demostrado que la infección por RV Wa en enteroides porcinos se ve potenciada por la presencia del antígeno H²⁷⁷, no se sabe cómo los niveles de *Fut2* podrían afectar a la infección por RV y NoV en ratones. Además, otro mediador de entrada de RV P[8], el antígeno Le^b, no se produce en este hospedador⁴⁵ y la bibliografía acerca de la interacción con NoV es mucho más escasa. Además, en el estudio con ratones tratados con antibióticos e infectados con la cepa murina EDIM, donde se relacionó una menor expresión de IL22 con la mayor replicación de RV, curiosamente, cuando administraron IL22 a ratones *knock-out* para *Fut2* tratados con antibióticos, la replicación se inhibió del mismo modo que en los ratones normales, por lo que los investigadores sugirieron una relación independiente con este gen, siendo más influyente la respuesta inmune modulada por la microbiota⁹⁹. Igualmente, se debe tener en cuenta que otros receptores y co-receptores podrían estar implicados en la infección por estos virus^{42,54} y que no se puede atribuir el nivel de glicosilación a un único taxón, sino que más bien habría un equilibrio entre el efecto ejercido por toda la comunidad microbiana establecida. Por tanto, como se puede observar, la bibliografía científica no ha aportado resultados concluyentes sobre esta cuestión, por lo que haría falta realizar más estudios acerca del papel de los HBGAs en la infección en ratones.

Los resultados obtenidos del experimento con ratones nos llevan a plantearnos una serie de futuros experimentos. Para confirmar los efectos de cada uno de los taxones sobre la infección viral, así como el posible efecto de los antibióticos, sería necesario realizar más ensayos con ratones axénicos mediante la inoculación de cada uno de los taxones más relevantes de este estudio. Por último, también sería conveniente analizar

IX. DISCUSIÓN

la expresión de la respuesta inmune en diferentes momentos del experimento, así como retrasar el sacrificio de los animales para estudiar la respuesta inmune adaptativa. Lamentablemente, no pudimos establecer una conexión entre la glicosilación de FUT2 y la infección por estos virus, por lo que sería necesario investigar más a fondo esta relación.

En resumen, nuestros datos muestran una asociación entre el estado de salud (microbiota no alterada y respuesta inmune normal) y la menor susceptibilidad a la infección por virus humanos en el modelo animal, ya que el simple hecho de tratar con antibióticos (perturbación del nicho intestinal) fue suficiente para promover la replicación de RV y NoV. También mostramos que, en el modelo de trasplante realizado, la microbiota humana no tuvo un gran impacto sobre la promoción de la infección por NoV en el ratón, aunque sí favoreció la replicación de RV al mismo nivel que los antibióticos. Por otro lado, aunque los mecanismos que subyacen al desarrollo de HRV y HuNoV en ratones tratados con antibióticos aún se desconocen, nuestros resultados sugieren que la microbiota propia del ratón restringe la infección por RV Wa. Aunque no podemos descartar otros mecanismos (como la adhesión a componentes bacterianos), posiblemente este efecto inhibitorio sea favorecido por la promoción adecuada de la respuesta inmune innata. A su vez, la administración de antibióticos provocó el establecimiento de otras bacterias que favorecieron la infección. De nuevo, aunque no descartamos otros mecanismos, también implicaría la modulación de la respuesta inmune. Respecto a NoV, el mayor nivel de excreción viral fue independiente del tipo de microbiota y más bien respondió a la menor abundancia de bacterias. Aunque el tratamiento con antibióticos también dio lugar al establecimiento de bacterias permisivas de la infección por NoV, es posible que el propio efecto de los antibióticos pudiera influir sobre una mayor accesibilidad de las partículas virales al intestino, al disminuir el número total de bacterias intestinales. Además, no se puede descartar el efecto indirecto de los antibióticos en la promoción de la infección al alterar la respuesta inmune innata. Por tanto, en general, los antibióticos dieron lugar a la alteración del perfil microbiano, cuya consecuencia fue una disminución de la respuesta antiviral, lo cual, en última instancia, provocó una mayor susceptibilidad a la infección por HRV y HuNoV en los ratones. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el tratamiento

IX. DISCUSIÓN

excesivo con antibióticos puede ser contraproducente para una respuesta eficiente en humanos frente a diversos patógenos entéricos.

Por último, habida cuenta de las limitaciones halladas en esta tesis, esta investigación proporciona una comprensión más profunda de las complejas interacciones entre la microbiota intestinal y los virus entéricos, como RV y NoV. Se identificaron bacterias específicas que interactúan con las cepas más relevantes de estos virus en muestras clínicas y se ampliaron los conocimientos sobre su posible papel en la infección viral. Además, hemos establecido un nuevo modelo murino inmunocompetente para estudiar la replicación de estos virus *in vivo* y hemos encontrado diversos taxones relacionados con la infección de RV Wa y NoV GII.4 Sydney 2012 P{16}, al mismo tiempo que hemos dilucidado un posible mecanismo por el cual determinadas bacterias influyen sobre la infección por estos virus. Por tanto, estos hallazgos tendrían implicaciones importantes en la prevención y el tratamiento de las infecciones virales entéricas.

X. CONCLUSIONES



X. CONCLUSIONES

1. *Ruminococcus* spp. interacciona físicamente con rotavirus G1P[8] en muestras de heces de niños infectados por rotavirus.
2. *Ruminococcus gauvreauii* expresa azúcares de tipo HBGAs en su superficie, dando una explicación a la interacción entre rotavirus y este grupo bacteriano.
3. El tratamiento de monocapas de células Caco2 diferenciadas con *Ruminococcus gauvreauii* disminuye la infección de rotavirus Wa en cultivo celular.
4. *Rhodococcus* spp. interacciona físicamente con norovirus GII.4 Sydney 2012 en muestras de heces de niños infectadas por norovirus.
5. *Rhodococcus* spp. expresa azúcares similares a los antígenos del grupo histosanguíneo en su superficie y/o en su exopolisacárido, dando una explicación a la interacción entre norovirus y este grupo bacteriano.
6. En los experimentos de desplazamiento y exclusión, *Rhodococcus rhodochrous* disminuye la adhesión de las VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012 a la monocapa de células HT-29M6.
7. En el experimento de exclusión competitiva, *Rhodococcus rhodochrous* aumenta la adhesión de las VLPs de norovirus GII.4 Sydney 2012 a la monocapa de células HT-29M6.
8. El tratamiento con antibióticos disminuye la abundancia y diversidad microbiana y se asocia con una mayor excreción de rotavirus Wa y norovirus GII.4 Sydney 2012 P[16] en las heces de los ratones.
9. El trasplante de microbiota humana permite el mismo nivel de replicación de rotavirus Wa en el modelo de ratón que el grupo tratado únicamente con antibióticos.
10. La excreción de norovirus GII.4 Sydney 2012 P[16] en el grupo de ratones trasplantados con microbiota humana es menor que en el grupo tratado con antibióticos, pero mayor que en los grupos control y con autotransplante murino.
11. El estudio de la expresión de mediadores de la respuesta inmune innata tras la infección por rotavirus muestra una disminución de la expresión de *Il1 β* , *Cxcl15* (*IL8*), *Il10*, *Tlr2* y *Tnf α* asociadas al tratamiento con antibióticos.
12. El estudio de la expresión de mediadores de la respuesta inmune innata tras la infección por norovirus en el modelo murino muestra una disminución de la

X. CONCLUSIONES

expresión de *Tlr2* y *Tnf α* y un aumento en la expresión de *Il4* asociadas al tratamiento con antibióticos.

13. Los géneros *Oscillospira*, *Lactobacillus*, *Akkermansia*, *Allobaculum*, *Adlercreutzia*, *Odoribacter*, *Streptococcus*, *Ruminococcus* y *Bifidobacterium* correlacionan negativamente con la infección de rotavirus Wa en el modelo murino.
14. Los géneros *Lactococcus*, *Proteus* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae* correlacionan positivamente con la replicación de rotavirus Wa en el modelo murino.
15. Los géneros *Chryseobacterium*, *Sphingomonas* y *Lactococcus* correlacionan con la mayor excreción de norovirus GII.4 Sydney 2012 en las heces de los ratones.
16. No se encontraron géneros bacterianos asociados con la restricción de la replicación de norovirus GII.4 Sydney 2012 P[16] en el modelo murino.
17. La expresión de *Fut2* no correlacionó con la replicación de rotavirus Wa en los ratones, pero sí presentó menores niveles en los grupos tratados con antibióticos.
18. La expresión de *Fut2* correlacionó positivamente con los géneros propios de la microbiota murina, los cuales fueron considerados como restrictivos de la infección.
19. La expresión de *Fut2* correlacionó de forma moderada y negativa con la excreción de norovirus GII.4 Sydney 2012 P[16] en las heces de los ratones.
20. No se encontró correlación entre la expresión de *Fut2* y los géneros bacterianos relacionados con la infección en el modelo murino.

XI.BIBLIOGRAFÍA



XI. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death. Publicado en 2020. Fecha de acceso: 19 de junio de 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. World Health Organization (WHO). Diarrhoeal disease. Publicado en 2017. Fecha de acceso: 19 de junio de 2023. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
3. Eric F Donaldson, Lisa C Lindesmith, Anna D Lobue RSB. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev.* 2008 Oct;225:190-211. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00680.x
4. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, 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.* 2012 Feb;12(2):136-41. doi:10.1016/S1473-3099(11)70253-5
5. Murray C, Wang H, Naghavi M, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet.* 2016 Oct 8;388(10053):1459-1544. doi:10.1016/S0140-6736(16)31012-1
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Norovirus Burden and Trends. Publicado en 2023. Fecha de acceso: 19 de junio de 2023. <https://www.cdc.gov/norovirus/burden.html#worldwide>
7. Bucardo F, Lindgren PE, Svensson L, Nordgren J. Low prevalence of rotavirus and high prevalence of norovirus in hospital and community wastewater after introduction of rotavirus vaccine in Nicaragua. *PLoS One.* 2011;6(10):e25962. doi:10.1371/journal.pone.0025962
8. Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: A comprehensive review. *Journal of Clinical Virology.* 2009 Jan;44(1):1-8. doi:10.1016/j.jcv.2008.10.009

XI. BIBLIOGRAFÍA

9. Ben Lopman. *Global Burden of Norovirus and Prospects for Vaccine Development*. Publicado en 2015. Fecha de acceso: 19 de junio de 2023. <https://www.cdc.gov/norovirus/downloads/global-burden-report.pdf>
10. Bishop RF, Masendycz PJ, Bugg HC, Carlin JB, Barnes GL. Epidemiological patterns of rotaviruses causing severe gastroenteritis in young children throughout Australia from 1993 to 1996. *J Clin Microbiol*. 2001 Mar;39(3):1085-91. doi:10.1128/JCM.39.3.1085-1091.2001
11. Lee KY. Rotavirus infection-associated central nervous system complications: clinicoradiological features and potential mechanisms. *Clin Exp Pediatr*. 2022 Oct;65(10):483-493. doi:10.3345/cep.2021.01333
12. Estes MK & Kapikian AZ. Rotaviruses. In: David M. Knipe & Peter M. Howley (eds.). *Fields' Virology*. 5th ed. Lippincott, Williams & Wilkins; 2007:1918–1974. ISBN-10: 0781760607; ISBN-13: 978-0781760607
13. Sharma S, Hagbom M, Svensson L, Nordgren J. The Impact of Human Genetic Polymorphisms on Rotavirus Susceptibility, Epidemiology, and Vaccine Take. *Viruses*. 2020 Mar 17;12(3):324. doi:10.3390/V12030324
14. Dóro R, László B, Martella V, et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: Is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infection, Genetics and Evolution*. 2014;28:446-461. doi:10.1016/j.meegid.2014.08.017
15. Pesavento JB, Crawford SE, Estes MK, Venkataram Prasad B V. Rotavirus proteins: Structure and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;309:189-219. doi:10.1007/3-540-30773-7_7
16. Rodríguez JM, Luque D. Structural Insights into Rotavirus Entry. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019;1215:45-68. doi:10.1007/978-3-030-14741-9_3

XI. BIBLIOGRAFÍA

17. International Vaccine Access Center (IVAC) JHBS of PHealthV hub. Rotavirus Vaccine (Rota). Publicado en 2023. Fecha de acceso: 22 de junio de 2023. <https://view-hub.org/vaccine/rota?iso=COD>
18. Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, et al. Safety and Efficacy of an Attenuated Vaccine against Severe Rotavirus Gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*. 2006 Jan 5;354(1):11-22. doi:10.1056/nejmoa052434
19. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, et al. Safety and Efficacy of a Pentavalent Human–Bovine (WC3) Reassortant Rotavirus Vaccine. *New England Journal of Medicine*. 2006 Jan 5;354(1):23-33. doi:10.1056/NEJMoa052664
20. Bhandari N, Rongsen-Chandola T, Bavdekar A, et al. Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian children in the second year of life. *Vaccine*. 2014 Aug 11;32 Suppl 1:A110-6. doi:10.1016/j.vaccine.2014.04.079
21. Sadiq A, Bostan N. Comparative Analysis of G1P[8] Rotaviruses Identified Prior to Vaccine Implementation in Pakistan With Rotarix™ and RotaTeq™ Vaccine Strains. *Front Immunol*. 2020 Oct 2;11:562282. doi:10.3389/fimmu.2020.562282
22. Assis ASF, Valle DA, Antunes GR, et al. Rotavirus epidemiology before and after vaccine introduction. *J Pediatr (Rio J)*. 2013 Sep-Oct;89(5):470-6. doi:10.1016/j.jped.2013.02.019
23. Armah GE, Sow SO, Breiman RF, 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. *The Lancet*. 2010 Aug 21;376(9741):606-14. doi:10.1016/S0140-6736(10)60889
24. Bányai K, Estes MK, Martella V, Parashar UD. Viral gastroenteritis. *The Lancet*. 2018 Jul 14;392(10142):175-186. doi:10.1016/S0140-6736(18)31128-0
25. Huang P, Farkas T, Marionneau S, et al. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: Identification of 4 distinct strain-specific patterns. *Journal of Infectious Diseases*. 2003 Jul 1;188(1):19-31. doi:10.1086/375742

XI. BIBLIOGRAFÍA

26. Nordgren J, Svensson L. Genetic Susceptibility to Human Norovirus Infection: An Update. *Viruses*. 2019 Mar 6;11(3):226. doi:10.3390/v11030226
27. Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol*. 2019 Oct;100(10):1393-1406. doi:10.1099/jgv.0.001318
28. Jiang X, Liu Y, Tan M. Histo-blood group antigens as receptors for rotavirus, new understanding on rotavirus epidemiology and vaccine strategy. *Emerg Microbes Infect*. 2017 Apr 12;6(4):e22. doi:10.1038/emi.2017.30
29. Shanker S, Czakó R, Sapparapu G, et al. Structural basis for norovirus neutralization by an HBGA blocking human IgA antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Oct 4;113(40):E5830-E5837. doi:10.1073/pnas.1609990113
30. Tan M, Jiang X. Histo-blood group antigens: a common niche for norovirus and rotavirus. *Expert Rev Mol Med*. 2014 Mar 10;16:e5. doi:10.1017/ERM.2014.2
31. Estes MK, Graham DY, Mason BB. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J Virol*. 1981;39(3). doi:10.1128/jvi.39.3.879-888.1981
32. Rodríguez JM, Chichón FJ, Martín-Forero E, et al. New Insights into Rotavirus Entry Machinery: Stabilization of Rotavirus Spike Conformation Is Independent of Trypsin Cleavage. *PLoS Pathog*. 2014;10(5). doi:10.1371/journal.ppat.1004157
33. Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK, et al. Trypsin Cleavage Stabilizes the Rotavirus VP4 Spike. *J Virol*. 2001;75(13). doi:10.1128/jvi.75.13.6052-6061.2001
34. Bok K, Green KY. Norovirus Gastroenteritis in Immunocompromised Patients. *New England Journal of Medicine*. 2012;367(22). doi:10.1056/nejmra1207742
35. Tan M, Fang P, Chachiyo T, et al. Noroviral P particle: Structure, function and applications in virus–host interaction. *Virology*. 2008;382(1):115-123. doi:10.1016/J.VIROL.2008.08.047
36. Jiang XI, Wang M, Graham DY, Estes' MK, Plaza B, Section G. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol*. 1992;66(11):6527-6532. doi:10.1128/JVI.66.11.6527-6532.1992

XI. BIBLIOGRAFÍA

37. Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, et al. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie*. 2001;83(7). doi:10.1016/S0300-9084(01)01321-9
38. Barbé L, Le Moullac-Vaidye B, Echasserieu K, et al. Histo-blood group antigen-binding specificities of human rotaviruses are associated with gastroenteritis but not with in vitro infection. *Sci Rep*. 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-31005-4
39. Marionneau S, Ruvoën N, Le Moullac-Vaidye B, et al. Norwalk Virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology*. 2002;122(7). doi:10.1053/gast.2002.33661
40. Ayouni S, Sdiri-Loulizi K, de Rougemont A, et al. Rotavirus P[8] infections in persons with secretor and nonsecretor phenotypes, Tunisia. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(11). doi:10.3201/eid2111.141901
41. Peña-gil N, Santiso-bellón C, Gozalbo-rovira R, Buesa J, Monedero V, Rodríguez-díaz J. The role of host glycobiology and gut microbiota in rotavirus and norovirus infection, an update. *Int J Mol Sci*. 2021;22(24). doi:10.3390/ijms222413473
42. Arias CF, López S. Rotavirus cell entry: not so simple after all. *Curr Opin Virol*. 2021;48. doi:10.1016/j.coviro.2021.03.011
43. Böhm R, Fleming FE, Maggioni A, et al. Revisiting the role of histo-blood group antigens in rotavirus host-cell invasion. *Nat Commun*. 2015;6. doi:10.1038/ncomms6907
44. Fix J, Chandrashekhar K, Perez J, et al. Association between gut microbiome composition and rotavirus vaccine response among Nicaraguan infants. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2020;102(1). doi:10.4269/ajtmh.19-0355
45. Xu S, Ahmed LU, Stuckert MR, et al. Molecular basis of P[II] major human rotavirus VP8* domain recognition of histo-blood group antigens. *PLoS Pathog*. 2020;16(3). doi:10.1371/journal.ppat.1008386

XI. BIBLIOGRAFÍA

46. Huang P, Xia M, Tan M, et al. Spike Protein VP8* of Human Rotavirus Recognizes Histo-Blood Group Antigens in a Type-Specific Manner. *J Virol.* 2012;86(9). doi:10.1128/jvi.05507-11
47. Xu S, McGinnis KR, Liu Y, et al. Structural basis of P[II] rotavirus evolution and host ranges under selection of histo-blood group antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(36). doi:10.1073/pnas.2107963118
48. Liu Y, Xu S, Woodruff AL, et al. Structural basis of glycan specificity of P[19] VP8*: Implications for rotavirus zoonosis and evolution. *PLoS Pathog.* 2017;13(11). doi:10.1371/journal.ppat.1006707
49. Gozalbo-Rovira R, Ciges-Tomas JR, Vila-Vicent S, et al. Unraveling the role of the secretor antigen in human rotavirus attachment to histo-blood group antigens. *PLoS Pathog.* 2019;15(6). doi:10.1371/journal.ppat.1007865
50. Lee SK, Oh SJ, Choi S, et al. Relationship between rotavirus P[6] infection in korean neonates and histo-blood group antigen: A single-center study. *Ann Lab Med.* 2020;41(2). doi:10.3343/alm.2021.41.2.181
51. Hu L, Sankaran B, Laucirica DR, et al. Glycan recognition in globally dominant human rotaviruses. *Nat Commun.* 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-05098-4
52. Huang P, Farkas T, Zhong W, et al. Norovirus and Histo-Blood Group Antigens: Demonstration of a Wide Spectrum of Strain Specificities and Classification of Two Major Binding Groups among Multiple Binding Patterns. *J Virol.* 2005;79(11). doi:10.1128/jvi.79.11.6714-6722.2005
53. Carmona-Vicente N, Vila-Vicent S, Allen D, et al. Characterization of a Novel Conformational GII.4 Norovirus Epitope: Implications for Norovirus-Host Interactions. *J Virol.* 2016;90(17):7703. doi:10.1128/JVI.01023-16
54. Almand EA, Moore MD, Jaykus LA. Norovirus binding to ligands beyond histo-blood group antigens. *Front Microbiol.* 2017;8(DEC). doi:10.3389/fmicb.2017.02549

XI. BIBLIOGRAFÍA

55. Zheng L, Zhang H, Ma J, et al. Phylogenetic and biological characterizations of a GI.3 norovirus. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020;85. doi:10.1016/j.meegid.2020.104554
56. Kong F, Saif LJ, Wang Q. Roles of bile acids in enteric virus replication. *Animal Diseases*. 2021;1(1). doi:10.1186/S44149-021-00003-X
57. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science (1979)*. 2016;353(6306). doi:10.1126/science.aaf5211
58. Kilic T, Koromyslova A, Hansman GS. Structural Basis for Human Norovirus Capsid Binding to Bile Acids. *J Virol*. 2019;93(2). doi:10.1128/JVI.01581-18
59. Nelson CA, Wilen CB, Dai YN, et al. Structural basis for murine norovirus engagement of bile acids and the CD300lf receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Sep 25;115(39):E9201-E9210. doi:10.1073/pnas.1805797115
60. Ayyar BV, Ettayebi K, Salmen W, et al. CLIC and membrane wound repair pathways enable pandemic norovirus entry and infection. *Nat Commun*. 2023;14(1). doi:10.1038/S41467-023-36398-Z
61. Costantini VP, Cooper EM, Hardaker HL, et al. Epidemiologic, Virologic, and Host Genetic Factors of Norovirus Outbreaks in Long-term Care Facilities. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;62(1). doi:10.1093/cid/civ747
62. Jin M, He Y, Li H, et al. Two Gastroenteritis Outbreaks Caused by GII Noroviruses: Host Susceptibility and HBGA Phenotypes. *PLoS One*. 2013;8(3). doi:10.1371/journal.pone.0058605
63. Carlsson B, Kindberg E, Buesa J, et al. The G428A nonsense mutation in FUT2 provides strong but not absolute protection against symptomatic GII.4 norovirus infection. *PLoS One*. 2009;4(5). doi:10.1371/journal.pone.0005593
64. Pérez-Ortín R, Vila-Vicent S, Carmona-Vicente N, Santiso-Bellón C, Rodríguez-Díaz J, Buesa J. Histo-blood group antigens in children with symptomatic rotavirus infection. *Viruses*. 2019;11(4). doi:10.3390/v11040339

XI. BIBLIOGRAFÍA

65. Nordgren J, Sharma S, Bucardo F, et al. Both lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. *Clinical Infectious Diseases*. 2014;59(11). doi:10.1093/cid/ciu633
66. Zhang XF, Long Y, Tan M, et al. P[8] and P[4] Rotavirus Infection Associated with Secretor Phenotypes among Children in South China. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep34591
67. Thorven M, Grahn A, Hedlund KO, et al. A Homozygous Nonsense Mutation (428G→A) in the Human Secretor (FUT2) Gene Provides Resistance to Symptomatic Norovirus (GII) Infections. *J Virol*. 2005;79(24). doi:10.1128/jvi.79.24.15351-15355.2005
68. Tan M, Jin M, Xie H, Duan Z, Jiang X, Fang Z. Outbreak studies of a GII-3 and a GII-4 norovirus revealed an association between HBGA phenotypes and viral infection. *J Med Virol*. 2008;80(7). doi:10.1002/jmv.21200
69. Frenc R, Bernstein DI, Xia M, et al. Predicting susceptibility to norovirus GII.4 by use of a challenge model involving humans. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;206(9). doi:10.1093/infdis/jis514
70. Weiss GA, Hennot T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017;74(16). doi:10.1007/s00018-017-2509-x
71. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïs CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(4). doi:10.1038/nri.2017.7
72. Pickard JM, Chervonsky A V. Intestinal Fucose as a Mediator of Host–Microbe Symbiosis. *The Journal of Immunology*. 2015;194(12). doi:10.4049/jimmunol.1500395
73. Pickard JM, Maurice CF, Kinnebrew MA, et al. Rapid fucosylation of intestinal epithelium sustains host-commensal symbiosis in sickness. *Nature*. 2014;514(7524). doi:10.1038/nature13823

XI. BIBLIOGRAFÍA

74. Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature*. 2013;502(7469). doi:10.1038/nature12503
75. Chow J, Mazmanian SK. A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. *Cell Host Microbe*. 2010;7(4). doi:10.1016/j.chom.2010.03.004
76. Stecher B, Maier L, Hardt WD. “Blooming” in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nature Reviews Microbiology* 2013 11:4. 2013;11(4):277-284. doi:10.1038/nrmicro2989
77. Stecher B, Robbiani R, Walker AW, et al. Salmonella enterica serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007;5(10). doi:10.1371/journal.pbio.0050244
78. Curtis MA, Percival RS, Devine D, et al. Temperature-dependent modulation of Porphyromonas gingivalis lipid A structure and interaction with the innate host defenses. *Infect Immun*. 2011;79(3). doi:10.1128/IAI.00900-10
79. Tan Y, Zanoni I, Cullen TW, Goodman AL, Kagan JC. Mechanisms of Toll-like Receptor 4 Endocytosis Reveal a Common Immune-Evasion Strategy Used by Pathogenic and Commensal Bacteria. *Immunity*. 2015;43(5). doi:10.1016/j.immuni.2015.10.008
80. d’Hennezel E, Abubucker S, Murphy LO, Cullen TW. Total Lipopolysaccharide from the Human Gut Microbiome Silences Toll-Like Receptor Signaling. *mSystems*. 2017;2(6). doi:10.1128/msystems.00046-17
81. Vatanen T, Kostic AD, D’Hennezel E, et al. Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell*. 2016;165(4). doi:10.1016/j.cell.2016.04.007
82. Pither MD, Illiano A, Pagliuca C, et al. Bacteroides thetaiotaomicron rough-type lipopolysaccharide: The chemical structure and the immunological activity. *Carbohydr Polym*. 2022 Dec 1;297:120040. doi: 10.1016/j.carbpol.2022.120040.

XI. BIBLIOGRAFÍA

83. Monedero V, Rodríguez-Díaz J. Intestinal Microbiota and Susceptibility to Viral Infections: Role of Probiotics. *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*. 2016:813–26. doi: 10.1016/B978-0-12-802189-7.00062-9
84. Li N, Ma WT, Pang M, Fan QL, Hua JL. The Commensal Microbiota and Viral Infection: A Comprehensive Review. *Front Immunol*. 2019 Jul 4;10:1551. doi: 10.3389/fimmu.2019.01551
85. Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*. 2018 Jun 13;361:k2179. doi: 10.1136/bmj.k2179
86. Sullender ME, Baldridge MT. Norovirus interactions with the commensal microbiota. *PLoS Pathog*. 2018;14(9). doi:10.1371/journal.ppat.1007183
87. Desselberger U. Significance of the gut microbiome for viral diarrheal and extra-intestinal diseases. *Viruses*. 2021;13(8). doi:10.3390/v13081601
88. Monedero V, Buesa J, Rodríguez-Díaz J. The interactions between host glycobiology, bacterial microbiota, and viruses in the gut. *Viruses*. 2018;10(2):1-14. doi:10.3390/v10020096
89. Lei, S., Twitchell, E., Yuan, L. (2018). Pathogenesis, Immunity and the Role of Microbiome/Probiotics in Enteric Virus Infections in Humans and Animal Models. In: Sun, J., Dudeja, P. (eds). *Mechanisms Underlying Host-Microbiome Interactions in Pathophysiology of Human Diseases. Physiology in Health and Disease*. Springer, Boston, MA. 2018:pp 55-78. doi:10.1007/978-1-4939-7534-1_3 Online ISBN: 978-1-4939-7534-1
90. Rees CM, Hall NJ, Fleming P, Eaton S. Probiotics for the prevention of surgical necrotising enterocolitis: Systematic review and meta-analysis. *BMJ Paediatr Open*. 2017;1(1). doi:10.1136/bmjpo-2017-000066
91. Wu Y, Zhang Q, Ren Y, Ruan Z. Effect of probiotic *Lactobacillus* on lipid profile: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *PLoS One*. 2017;12(6). doi:10.1371/journal.pone.0178868

XI. BIBLIOGRAFÍA

92. Ahmadi E, Alizadeh-Navaei R, Rezai MS. Efficacy of probiotic use in acute rotavirus diarrhea in children: A systematic review and meta-analysis. *Caspian J Intern Med*. 2015 Fall;6(4):187-95. PMID: 26644891
93. Zhao Y, Dong BR, Hao Q. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2022;2022(8). doi:10.1002/14651858.CD006895.pub4
94. Michael H, Paim FC, Langel SN, et al. Escherichia coli Nissle 1917 Enhances Innate and Adaptive Immune Responses in a Ciprofloxacin-Treated Defined-Microbiota Piglet Model of Human Rotavirus Infection. *mSphere*. 2021;6(2). doi:10.1128/msphere.00074-21
95. Paim FC, Langel SN, Fischer DD, et al. Effects of Escherichia coli Nissle 1917 and Ciprofloxacin on small intestinal epithelial cell mRNA expression in the neonatal piglet model of human rotavirus infection. *Gut Pathog*. 2016;8(1). doi:10.1186/s13099-016-0148-7
96. Kandasamy S, Vlasova AN, Fischer D, et al. Differential Effects of Escherichia coli Nissle and Lactobacillus rhamnosus Strain GG on Human Rotavirus Binding, Infection, and B Cell Immunity. *The Journal of Immunology*. 2016;196(4). doi:10.4049/jimmunol.1501705
97. Vlasova AN, Shao L, Kandasamy S, et al. Escherichia coli Nissle 1917 protects gnotobiotic pigs against human rotavirus by modulating pDC and NK-cell responses. *Eur J Immunol*. 2016;46(10). doi:10.1002/eji.201646498
98. Zhang B, Chassaing B, Shi Z, et al. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. *Science*. 2014;346(6211). doi:10.1126/science.1256999
99. Schnepf D, Hernandez P, Mahlaköiv T, et al. Rotavirus susceptibility of antibiotic-treated mice ascribed to diminished expression of interleukin-22. *PLoS One*. 2021;16(8 August). doi:10.1371/journal.pone.0247738

XI. BIBLIOGRAFÍA

100. Shi Z, Zou J, Zhang Z, et al. Segmented Filamentous Bacteria Prevent and Cure Rotavirus Infection. *Cell*. 2019;179(3). doi:10.1016/j.cell.2019.09.028
101. Li D, Breiman A, le Pendu J, Uyttendaele M. Anti-viral effect of Bifidobacterium adolescentis against noroviruses. *Front Microbiol*. 2016 Jun 8;7:864. doi: 10.3389/fmicb.2016.00864
102. Rubio-del-Campo A, Coll-Marqués JM, Yebra MJ, et al. Noroviral P-particles as an in vitro model to assess the interactions of noroviruses with probiotics. *PLoS One*. 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0089586
103. Lei S, Ramesh A, Twitchell E, et al. High protective efficacy of probiotics and rice bran against human norovirus infection and diarrhea in gnotobiotic pigs. *Front Microbiol*. 2016 Nov 2;7:1699. doi:10.3389/fmicb.2016.01699
104. Lee H, Ko GP. Antiviral effect of Vitamin A on norovirus infection via modulation of the gut microbiome. *Sci Rep*. May 16;6:25835. doi:10.1038/srep25835
105. Grau KR, Zhu S, Peterson ST, et al. The intestinal regionalization of acute norovirus infection is regulated by the microbiota via bile acid-mediated priming of type III interferon. *Nat Microbiol*. 2020;5(1). doi:10.1038/s41564-019-0602-7
106. Yang XL, Wang G, Xie JY, et al. The intestinal microbiome primes host innate immunity against enteric virus systemic infection through type I interferon. *mBio*. 2021;12(3). doi:10.1128/mBio.00366-21
107. Stefan KL, Kim M V., Iwasaki A, Kasper DL. Commensal Microbiota Modulation of Natural Resistance to Virus Infection. *Cell*. 2020;183(5). doi:10.1016/j.cell.2020.10.047
108. Antunes KH, Fachi JL, de Paula R, et al. Microbiota-derived acetate protects against respiratory syncytial virus infection through a GPR43-type 1 interferon response. *Nat Commun*. 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-11152-6
109. Miura T, Sano D, Suenaga A, et al. Histo-Blood Group Antigen-Like Substances of Human Enteric Bacteria as Specific Adsorbents for Human Noroviruses. *J Virol*. 2013;87(17). doi:10.1128/jvi.01060-13

XI. BIBLIOGRAFÍA

110. Kuss SK, Best GT, Etheredge CA, et al. Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis. *Science*. 2011;334(6053). doi:10.1126/science.1211057
111. Jones MK, Watanabe M, Zhu S, et al. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science*. 2014;346(6210):755-759. doi:10.1126/science.1257147
112. Li D, Breiman A, le Pendu J, Uyttendaele M. Binding to histo-blood group antigen-expressing bacteria protects human norovirus from acute heat stress. *Front Microbiol*. 2015;6(JUL). doi:10.3389/fmicb.2015.00659
113. Domínguez-Díaz C, García-Orozco A, Riera-Leal A, Padilla-Arellano JR, Fafutis-Morris M. Microbiota and Its Role on Viral Evasion: Is It With Us or Against Us? *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9(JUL):256. doi:10.3389/FCIMB.2019.00256
114. Kane M, Case LK, Kopaskie K, et al. Successful transmission of a retrovirus depends on the commensal microbiota. *Science*. 2011;334(6053). doi:10.1126/science.1210718
115. Aguilera ER, Nguyen Y, Sasaki J, Pfeiffer JK. Bacterial Stabilization of a Panel of Picornaviruses. *mSphere*. 2019;4(2). doi:10.1128/msphere.00183-19
116. Robinson CM, Jesudhasan PR, Pfeiffer JK. Bacterial lipopolysaccharide binding enhances virion stability and promotes environmental fitness of an enteric virus. *Cell Host Microbe*. 2014;15(1). doi:10.1016/j.chom.2013.12.004
117. Uchiyama R, Chassaing B, Zhang B, Gewirtz AT. Antibiotic treatment suppresses rotavirus infection and enhances specific humoral immunity. *Journal of Infectious Diseases*. 2014;210(2). doi:10.1093/infdis/jiu037
118. Fenaux M, Cuadras MA, 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(11). doi:10.1128/jvi.02664-05

XI. BIBLIOGRAFÍA

119. Lei S, Twitchell EL, Ramesh AK, et al. Enhanced GII.4 human norovirus infection in gnotobiotic pigs transplanted with a human gut microbiota. *J Gen Virol*. 2019;100(11):1530-1540. doi:10.1099/jgv.0.001336
120. Yi W, Shao J, Zhu L, et al. Escherichia coli O86 O-antigen biosynthetic gene cluster and stepwise enzymatic synthesis of human blood group B antigen tetrasaccharide. *J Am Chem Soc*. 2005;127(7). doi:10.1021/ja045021y
121. Rasko DA, Wang G, Monteiro MA, Palcic MM, Taylor DE. Synthesis of mono- and di-fucosylated type I Lewis blood group antigens by Helicobacter pylori. *Eur J Biochem*. 2000;267(19). doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01683.x
122. Wilks J, Lien E, Jacobson AN, et al. Mammalian Lipopolysaccharide Receptors Incorporated into the Retroviral Envelope Augment Virus Transmission. *Cell Host Microbe*. 2015;18(4). doi:10.1016/j.chom.2015.09.005
123. Srivastava V, Deblais L, Huang HC, et al. Reduced rotavirus vaccine efficacy in protein malnourished human-faecal-microbiota-transplanted gnotobiotic pig model is in part attributed to the gut microbiota. *Benef Microbes*. 2020;11(8). doi:10.3920/BM2019.0139
124. Forbes JD, Van Domselaar G, Bernstein CN. The gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases. *Front Microbiol*. 2016;7(JUL). doi:10.3389/fmicb.2016.01081
125. Garrett WS, Gallini CA, Yatsunenko T, et al. Enterobacteriaceae Act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host Microbe*. 2010;8(3). doi:10.1016/j.chom.2010.08.004
126. Kanareykina SK, Misautova AA, Zlatkina AR, Levina EN. Proteus dysbioses in patients with ulcerative colitis. *Food/Nahrung*. 1987;31(5-6). doi:10.1002/food.19870310570
127. Baldridge MT, Nice TJ, McCune BT, et al. Commensal microbes and interferon- λ determine persistence of enteric murine norovirus infection. *Science*. 2015;347(6219). doi:10.1126/science.1258025

XI. BIBLIOGRAFÍA

128. Desselberger U. Differences of rotavirus vaccine effectiveness by country: Likely causes and contributing factors. *Pathogens*. 2017;6(4). doi:10.3390/pathogens6040065
129. Gupta VK, Paul S, Dutta C. Geography, ethnicity or subsistence-specific variations in human microbiome composition and diversity. *Front Microbiol*. 2017;8(JUN). doi:10.3389/fmicb.2017.01162
130. Madhi SA, Cunliffe NA, Steele D, et al. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *Malawi Medical Journal*. 2016;28(3). doi:10.1056/NEJMoa0904797
131. Nordgren J, Nitiema LW, Ouermi D, Simpore J, Svensson L. Host Genetic Factors Affect Susceptibility to Norovirus Infections in Burkina Faso. *PLoS One*. 2013;8(7). doi:10.1371/journal.pone.0069557
132. Larsson MM, Rydell GEP, Grahn A, et al. Antibody Prevalence and Titer to Norovirus (Genogroup II) Correlate with Secretor (FUT2) but Not with ABO Phenotype or Lewis (FUT3) Genotype. *J Infect Dis*. 2006;194(10):1422-1427. doi:10.1086/508430
133. Nordgren J, Sharma S, Bucardo F, et al. Both Lewis and Secretor Status Mediate Susceptibility to Rotavirus Infections in a Rotavirus Genotype-Dependent Manner. *Clin Infect Dis*. 2014;59(11):1567. doi:10.1093/CID/CIU633
134. Harris VC, Armah G, Fuentes S, et al. Significant Correlation between the Infant Gut Microbiome and Rotavirus Vaccine Response in Rural Ghana. *Journal of Infectious Diseases*. 2017;215(1). doi:10.1093/infdis/jiw518
135. Harris V, Ali A, Fuentes S, et al. Rotavirus vaccine response correlates with the infant gut microbiota composition in Pakistan. *Gut Microbes*. 2018;9(2):93-101. doi:10.1080/19490976.2017.1376162
136. Robertson RC, Church JA, Edens TJ, et al. The fecal microbiome and rotavirus vaccine immunogenicity in rural Zimbabwean infants. *Vaccine*. 2021;39(38). doi:10.1016/j.vaccine.2021.07.076

XI. BIBLIOGRAFÍA

137. Parker EPK, Praharaj I, Zekavati A, et al. Influence of the intestinal microbiota on the immunogenicity of oral rotavirus vaccine given to infants in south India. *Vaccine*. 2018;36(2). doi:10.1016/j.vaccine.2017.11.031
138. Harris VC, Haak BW, Handley SA, et al. Effect of Antibiotic-Mediated Microbiome Modulation on Rotavirus Vaccine Immunogenicity: A Human, Randomized-Control Proof-of-Concept Trial. *Cell Host Microbe*. 2018;24(2). doi:10.1016/j.chom.2018.07.005
139. Kazi AM, Cortese MM, Yu Y et al. Secretor and Salivary ABO Blood Group Antigen Status Predict Rotavirus Vaccine Take in Infants. *J Infect Dis*. 2017 Mar 1;215(5):786-789. doi: 10.1093/infdis/jix028
140. Armah GE, Cortese MM, Dennis FE et al. Rotavirus Vaccine Take in Infants Is Associated With Secretor Status. *J Infect Dis*. 2019 Feb 15;219(5):746-749. doi: 10.1093/infdis/jiy573
141. Bucardo F, Nordgren J, Reyes Y, Gonzalez F, Sharma S, Svensson L. The Lewis A phenotype is a restriction factor for Rotateq and Rotarix vaccine-take in Nicaraguan children. *Sci Rep*. 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-19718-y
142. Rodríguez-díaz J, García-mantrana I, Vila-vicent S, Gozalbo- R. Relevance of secretor status genotype and microbiota composition in susceptibility to rotavirus and norovirus infections in humans. *Nature Publishing Group*. 2017;(March):1-10. doi:10.1038/srep45559
143. Vesikari T, Saez-Llorens X, Blazevic V, et al. Immunogenicity of a bivalent virus-like particle norovirus vaccine in children from 1 to 8 years of age: A phase 2 randomized, double-blind study. *Vaccine*. 2022;40(26). doi:10.1016/j.vaccine.2022.04.089
144. Bernstein DI, Atmar RL, Lyon GM, et al. Norovirus vaccine against experimental human GII.4 virus illness: A challenge study in healthy adults. *J Infect Dis*. 2015;211(6). doi:10.1093/infdis/jiu497

XI. BIBLIOGRAFÍA

145. Treanor JJ, Atmar RL, Frey SE, et al. A novel intramuscular bivalent norovirus viruslike particle vaccine candidate-reactogenicity, safety, and immunogenicity in a phase 1 trial in healthy adults. *J Infect Dis.* 2014;210(11). doi:10.1093/infdis/jiu337
146. Dubey AP, Rajeshwari K, Chakravarty A, Famularo G. Use of VSL[sharp]3 in the treatment of rotavirus diarrhea in children: preliminary results. *J Clin Gastroenterol.* 2008;42(S3)Pt 1:S126-9. doi: 10.1097/MCG.0b013e31816fc2f6.
147. Guarino A, Berni Canani R, Spagnuolo MI, Albano F, Di Benedetto L. Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997;25(5). doi:10.1097/00005176-199711000-00005
148. Rosenfeldt V, Fleischer Michaelsen K, Sci M, et al. Effect of probiotic Lactobacillus strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *Pediatr Infect Dis J.* 2002;21(5):411-427. doi:10.1097/01.inf.0000014470.82881.25
149. Gaón D, García H, Winter L, Rodríguez N, Quintás R, González SN, Oliver G. Effect of Lactobacillus strains and Saccharomyces boulardii on persistent diarrhea in children. *Medicina (B Aires).* 2003;63(4):293-8. PMID: 14518142
150. Szymański H, Pejcz J, Jawień M, Chmielarczyk A, Strus M, Heczko PB. Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three Lactobacillus rhamnosus strains - A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23(2). doi:10.1111/j.1365-2036.2006.02740.x
151. Mao M, Yu T, Xiong Y et al. Effect of a lactose-free milk formula supplemented with bifidobacteria and streptococci on the recovery from acute diarrhoea. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008;17(1):30-4. PMID: 18364323
152. Narayanappa D. Randomized double blinded controlled trial to evaluate the efficacy and safety of Bifilac in patients with acute viral diarrhea. *Indian J Pediatr.* 2008;75(7). doi:10.1007/s12098-008-0134-2

XI. BIBLIOGRAFÍA

153. Das S, Gupta PK, Das RR. Efficacy and safety of *saccharomyces boulardii* in acute rotavirus diarrhea: Double blind randomized controlled trial from a developing country. *J Trop Pediatr*. 2016;62(6). doi:10.1093/tropej/fmw032
154. Park MS, Kwon B, Ku S, Ji GE. The Efficacy of *Bifidobacterium longum* BORI and *Lactobacillus acidophilus* AD031 Probiotic Treatment in Infants with Rotavirus Infection. *Nutrients*. 2017;9(8). doi:10.3390/NU9080887
155. Shin DY, Yi DY, Jo S, et al. Effect of a new *Lactobacillus plantarum* product, LRCC5310, on clinical symptoms and virus reduction in children with rotaviral enteritis. *Medicine*. 2020;99(38). doi:10.1097/MD.00000000000022192
156. 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. doi:10.1186/1471-2334-10-253
157. Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz JZ, Armńska M, Mikołajczyk W. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *Journal of Pediatrics*. 2001;138(3). doi:10.1067/mpd.2001.111321
158. Freedman SB, Williamson-Urquhart S, Farion KJ, et al. Multicenter Trial of a Combination Probiotic for Children with Gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(21). doi:10.1056/nejmoa1802597
159. Chau TTH, Chau NNM, Le NTH, et al. A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial of *Lactobacillus acidophilus* for the Treatment of Acute Watery Diarrhea in Vietnamese Children. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2018;37(1). doi:10.1097/INF.0000000000001712
160. Dalgic N, Sancar M, Bayraktar B, Pullu M, Hasim O. Probiotic, zinc and lactose-free formula in children with rotavirus diarrhea: Are they effective? *Pediatrics International*. 2011;53(5). doi:10.1111/j.1442-200X.2011.03325.x
161. Dutta P, Mitra U, Dutta S, Rajendran K, Saha TK, Chatterjee MK. Randomised controlled clinical trial of *Lactobacillus sporogenes* (*Bacillus coagulans*), used as

XI. BIBLIOGRAFÍA

- probiotic in clinical practice, on acute watery diarrhoea in children. *Tropical Medicine and International Health*. 2011;16(5). doi:10.1111/j.1365-3156.2011.02745.x
162. Ritchie BK, Brewster DR, Tran CD, Davidson GP, McNeil Y, Butler RN. Efficacy of Lactobacillus GG in aboriginal children with acute diarrhoeal disease: A randomised clinical trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;50(6):619-624. doi:10.1097/MPG.0b013e3181bbf53d
163. Basu S, Chatterjee M, Ganguly S, Chandra PK. Efficacy of Lactobacillus rhamnosus GG in acute watery diarrhoea of Indian children: A randomised controlled trial. *J Paediatr Child Health*. 2007;43(12). doi:10.1111/j.1440-1754.2007.01201.x
164. Sarker SA, Sultana S, Fuchs GJ, 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(2). doi:10.1542/peds.2004-2334
165. Mastretta E, Longo P, Laccisaglia A et al. Effect of Lactobacillus GG and breast-feeding in the prevention of rotavirus nosocomial infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2002 Oct;35(4):527-31. doi: 10.1097/00005176-200210000-00013
166. Freedman SB, Xie J, Nettel-Aguirre A, et al. A randomized trial evaluating virus-specific effects of a combination probiotic in children with acute gastroenteritis. *Nat Commun*. 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-16308-3
167. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 1993 Sep;15(3):532-4, 536-7. PMID: 7692896
168. EUROROTANET. *Rotavirus Detection and Typing. Apendix II. Version 4 01.10.2009*; 2009. Disponible en:
<https://www.eurorotanet.com/project-information/documents-and-methods/>

XI. BIBLIOGRAFÍA

169. Iturriza Gómara M, Cubitt D, Desselberger U, Gray J. Amino acid substitution within the VP7 protein of G2 rotavirus strains associated with failure to serotype. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3796-3798. doi:10.1128/JCM.39.10.3796-3798.2001
170. Gentsch JR, Glass RI, Woods P et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992 Jun;30(6):1365-73. doi: 10.1128/jcm.30.6.1365-1373.1992
171. Gouvea V, Glass RI, Woods P et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1990 Feb;28(2):276-82. doi: 10.1128/jcm.28.2.276-282.1990
172. Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: Keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *Journal of Clinical Virology.* 2004;31(4):259-265. doi:10.1016/j.jcv.2004.04.009
173. Aladin F, Nawaz S, Iturriza-Gómara M, Gray J. Identification of G8 rotavirus strains determined as G12 by rotavirus genotyping PCR: Updating the current genotyping methods. *Journal of Clinical Virology.* 2010;47(4). doi:10.1016/j.jcv.2010.01.004
174. Iturriza-Gómara M, Green J, Brown DWG, Desselberger U, Gray JJ. Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: Implications for reverse transcription-PCR genotyping. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2). doi:10.1128/jcm.38.2.898-901.2000
175. Vinje J, Koopmans MPG. Molecular Detection and Epidemiology of Small Round-Structured Viruses in Outbreaks of Gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis.* 1996 Sep;174(3):610-5. doi: 10.1093/infdis/174.3.610
176. Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods.* 2002;100(1-2):107-114. doi:10.1016/S0166-0934(01)00404-9
177. Maes P, Matthijnsens J, Rahman M, Van Ranst M. RotaC: A web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* 2009;9. doi:10.1186/1471-2180-9-238

XI. BIBLIOGRAFÍA

178. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *Journal of Clinical Virology*. 2011;51:121-125. doi:10.1016/j.jcv.2011.03.006
179. Arnold M, Patton JT, McDonald SM. Culturing, storage, and quantification of rotaviruses. *Curr Protoc Microbiol*. 2009 Nov;Chapter 15:Unit 15C.3. doi: 10.1002/9780471729259.mc15c03s15
180. Jothikumar N, Kang G, Hill VR. Broadly reactive TaqMan® assay for real-time RT-PCR detection of rotavirus in clinical and environmental samples. *J Virol Methods*. 2009;155(2):126-131. doi:10.1016/j.jviromet.2008.09.025
181. Jothikumar N, Kang G, Hill VR. Broadly reactive TaqMan® assay for real-time RT-PCR detection of rotavirus in clinical and environmental samples. *J Virol Methods*. 2009;155(2):126-131. doi:10.1016/J.JVIROMET.2008.09.025
182. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2003;41(4):1548-1557. doi:10.1128/JCM.41.4.1548
183. Invitrogen of life echnologies™. *Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. An Efficient Site-Specific Transposition System to Generate Baculovirus for High-Level Expression of Recombinant Proteins*. Disponible en: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf
184. Madrigal JL, Jones MK. Quantifying human norovirus virus-like particles binding to commensal bacteria using flow cytometry. *Journal of Visualized Experiments*. 2020;2020(158). doi:10.3791/61048
185. Molinero N, Ruiz L, Milani C, et al. The human gallbladder microbiome is related to the physiological state and the biliary metabolic profile. *Microbiome*. 2019;7(1). doi:10.1186/s40168-019-0712-8

XI. BIBLIOGRAFÍA

186. Jothikumar N, Kang G, Hill VR. Broadly reactive TaqMan® assay for real-time RT-PCR detection of rotavirus in clinical and environmental samples. *J Virol Methods*. 2009;155(2):126-131. doi:10.1016/J.JVIROMET.2008.09.025
187. Wrzosek L, Ciocan D, Borentain P, et al. Transplantation of human microbiota into conventional mice durably reshapes the gut microbiota. *Sci Rep*. 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-25300-3
188. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118(2). doi:10.1016/j.cell.2004.07.002
189. Rubio-Del-Campo A, Gozalbo-Rovira R, Moya-González EM, Alberola J, Rodríguez-Díaz J, Yebra MJ. Infant gut microbiota modulation by human milk disaccharides in humanized microbiome mice. *Gut Microbes*. 2021;13(1). doi:10.1080/19490976.2021.1914377
190. Leclercq S, Mian FM, Stanisz AM, et al. Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. *Nat Commun*. 2017;8. doi:10.1038/ncomms15062
191. Spandidos A, Wang X, Wang H, Seed B. PrimerBank: A resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res*. 2009;38(SUPPL.1). doi:10.1093/nar/gkp1005
192. An H, Yu Y, Zhang M, et al. Involvement of ERK, p38 and NF- κ B signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology*. 2002;106(1):38. doi:10.1046/J.1365-2567.2002.01401.X
193. Keilbaugh SA, Shin ME, Banchereau RF, et al. Activation of RegIII β / γ and interferon γ expression in the intestinal tract of SCID mice: an innate response to bacterial colonisation of the gut. *Gut*. 2005;54(5):623. doi:10.1136/GUT.2004.056028
194. Cardona PJ, Gordillo S, Díaz J, et al. Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol

XI. BIBLIOGRAFÍA

- infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2003;71(10). doi:10.1128/IAI.71.10.5845-5854.2003
195. Xu L, Ma X, Cui B, Li X, Ning G, Wang S. Selection of reference genes for qRT-PCR in high fat diet-induced hepatic steatosis mice model. *Mol Biotechnol*. 2011;48(3). doi:10.1007/s12033-010-9366-2
196. Ramakers C, Ruijter JM, Lekanne Deprez RH, Moorman AFM. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*. 2003;339(1). doi:10.1016/S0304-3940(02)01423-4
197. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(9). doi:10.1093/nar/30.9.e36
198. Alm EW, Oerther DB, Larsen N, Stahl DA, Raskin L. The oligonucleotide probe database. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(10). doi:10.1128/aem.62.10.3557-3559.1996
199. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7(5). doi:10.1038/nmeth.f.303
200. Dhariwal A, Chong J, Habib S, King IL, Agellon LB, Xia J. MicrobiomeAnalyst: A web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1). doi:10.1093/nar/gkx295
201. Bray JR, Curtis JT. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol Monogr*. 1957;27(4). doi:10.2307/1942268
202. Chao A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics*. 1984;11(4); pp 265-270. doi:10.2307/4615964
203. Shannon CE. A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*. 1948;27(3). doi:10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x

XI. BIBLIOGRAFÍA

204. Monedero V, Collado MC, Rodríguez-Díaz J. Therapeutic Opportunities in Intestinal Microbiota–Virus Interactions. *Trends Biotechnol.* 2018;36(7):645-648. doi:10.1016/j.tibtech.2017.12.009
205. Kim AHJ, Hogarty MP, Harris VC, Baldridge MT. The Complex Interactions Between Rotavirus and the Gut Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;10. doi:10.3389/fcimb.2020.586751
206. Roth AN, Grau KR, Karst SM. Diverse mechanisms underlie enhancement of enteric viruses by the mammalian intestinal microbiota. *Viruses.* 2019;11(8). doi:10.3390/v11080760
207. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 2015;14(1). doi:10.1038/nrmicro3552
208. La Reau AJ, Meier-Kolthoff JP, Suen G. Sequence-based analysis of the genus *Ruminococcus* resolves its phylogeny and reveals strong host association. *Microb Genom.* 2016;2(12). doi:10.1099/mgen.0.000099
209. PeBenito A, Nazzari L, Wang C, et al. Comparative prevalence of *Oxalobacter formigenes* in three human populations. *Sci Rep.* 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-018-36670-z
210. Crost EH, Le Gall G, Laverde-Gomez JA, Mukhopadhyay I, Flint HJ, Juge N. Mechanistic insights into the cross-feeding of *Ruminococcus gnavus* and *Ruminococcus bromii* on host and dietary carbohydrates. *Front Microbiol.* 2018;9(NOV). doi:10.3389/fmicb.2018.02558
211. Ze X, Duncan SH, Louis P, Flint HJ. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME Journal.* 2012;6(8). doi:10.1038/ismej.2012.4
212. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe.* 2015;17(5). doi:10.1016/j.chom.2015.04.004

XI. BIBLIOGRAFÍA

213. Varyukhina S, Freitas M, Bardin S, et al. Glycan-modifying bacteria-derived soluble factors from *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Lactobacillus casei* inhibit rotavirus infection in human intestinal cells. *Microbes Infect.* 2012;14(3). doi:10.1016/j.micinf.2011.10.007
214. Muñoz JAM, Chenoll E, Casinos B, et al. Novel probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 strain active against rotavirus infections. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(24):8775-8783. doi:10.1128/AEM.05548-11
215. Thompson A, van Moorlehem E, Aich P. Probiotic-induced priming of innate immunity to protect against rotaviral infection. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2010;2(2):90-97. doi:10.1007/S12602-009-9032-9/FIGURES/3
216. Sagheddu V, Patrone V, Miragoli F, Puglisi E, Morelli L. Infant early gut colonization by *Lachnospiraceae*: High frequency of *Ruminococcus gnavus*. *Front Pediatr.* 2016;4(JUN). doi:10.3389/fped.2016.00057
217. Dinleyici EC, Martínez-Martínez D, Kara A, et al. Time series analysis of the microbiota of children suffering from acute infectious diarrhea and their recovery after treatment. *Front Microbiol.* 2018;9(JUN). doi:10.3389/fmicb.2018.01230
218. Ramakrishnan G, Ma JZ, Haque R, Petri WA. Rotavirus vaccine protection in low-income and middle-income countries. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(7). doi:10.1016/S1473-3099(19)30263-4
219. Garrido-Sanz D, Redondo-Nieto M, Martín M, Rivilla R. Comparative genomics of the *rhodococcus* genus shows wide distribution of biodegradation traits. *Microorganisms.* 2020;8(5). doi:10.3390/microorganisms8050774
220. Martínková L, Uhnáková B, Pátek M, Nešvera J, Křen V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environ Int.* 2009;35(1). doi:10.1016/j.envint.2008.07.018
221. Lin PC, Yang YCSH, Lin SC, et al. Clinical significance and intestinal microbiota composition in immunocompromised children with norovirus gastroenteritis. *PLoS One.* 2022;17(4 April). doi:10.1371/journal.pone.0266876

XI. BIBLIOGRAFÍA

222. Sutcliffe IC. Cell envelope composition and organisation in the genus *Rhodococcus*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. 1998;74(1-3). doi:10.1023/A:1001747726820
223. Urai M, Yoshizaki H, Anzai H, et al. Structural analysis of mucoidan, an acidic extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4. *Carbohydr Res*. 2007;342(7). doi:10.1016/j.carres.2007.02.002
224. Perry MB, MacLean LL, Patrauchan MA, Vinogradov E. The structure of the exocellular polysaccharide produced by *Rhodococcus* sp. RHA1. *Carbohydr Res*. 2007;342(15). doi:10.1016/j.carres.2007.07.002
225. Hu X, Li D, Qiao Y, et al. Purification, characterization and anticancer activities of exopolysaccharide produced by *Rhodococcus erythropolis* HX-2. *Int J Biol Macromol*. 2020;145. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.228
226. Palm E, Danskog K, Nord S, et al. Bile acids accumulate norovirus-like particles and enhance binding to and entry into human enteric epithelial cells. *bioRxiv*. Published online January 1, 2023:2023.04.28.538707. doi:10.1101/2023.04.28.538707
227. Guo CT, Ohta S, Yoshimoto A, et al. A unique phosphatidylinositol bearing a novel branched-chain fatty acid from *Rhodococcus equi* binds to influenza virus hemagglutinin and inhibits the infection of cells. *J Biochem*. 2001;130(3). doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002996
228. Sugimoto N, Sumi Y, Fujita T et al. Protective effects of glycolipids (Rt. GM-2) containing mycolic acid from *Rhodococcus terrae* on influenza virus infection in mice]. *Kansenshogaku Zasshi*. 1987 Nov;61(11):1248-51. doi: 10.11150/kansenshogakuzasshi1970.61.1248
229. Esposito FP, Giugliano R, Sala G Della, et al. Combining osmac approach and untargeted metabolomics for the identification of new glycolipids with potent antiviral activity produced by a marine rhodococcus. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16). doi:10.3390/ijms22169055

XI. BIBLIOGRAFÍA

230. Rodríguez-Díaz J, Monedero V. Probiotics against Digestive Tract Viral Infections. In: *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease: Bioactive Foods in Chronic Disease States*. Elsevier; 2012:271-284. doi:10.1016/B978-0-12-397154-8.00031-2
231. Almand EA, Moore MD, Outlaw J, Jaykus LA. Human norovirus binding to select bacteria representative of the human gut microbiota. *PLoS One*. 2017;12(3). doi:10.1371/journal.pone.0173124
232. Ramig RF. The effects of host age, virus dose, and virus strain on heterologous rotavirus infection of suckling mice. *Microb Pathog*. 1988;4(3). doi:10.1016/0882-4010(88)90069-1
233. Riddle MS, Walker RI. Status of vaccine research and development for norovirus. *Vaccine*. 2016;34(26). doi:10.1016/j.vaccine.2016.03.077
234. Troeger C, Khalil IA, Rao PC, et al. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea among Children Younger Than 5 Years. *JAMA Pediatr*. 2018;172(10). doi:10.1001/jamapediatrics.2018.1960
235. Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MPG, Estes MK. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology*. 2004;85(1). doi:10.1099/vir.0.19478-0
236. Witjes VM, Boleij A, Halffman W. Reducing versus embracing variation as strategies for reproducibility: The microbiome of laboratory mice. *Animals*. 2020;10(12). doi:10.3390/ani10122415
237. Konikoff T, Gophna U. Oscillospira: a Central, Enigmatic Component of the Human Gut Microbiota. *Trends Microbiol*. 2016;24(7). doi:10.1016/j.tim.2016.02.015
238. Di JB, Gai ZT. Protective efficacy of probiotics on the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: An updated meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(18). doi:10.26355/eurev_202009_23057
239. Vlasova AN, Chattha KS, Kandasamy S, et al. Lactobacilli and Bifidobacteria Promote Immune Homeostasis by Modulating Innate Immune Responses to

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Human Rotavirus in Neonatal Gnotobiotic Pigs. *PLoS One*. 2013;8(10). doi:10.1371/journal.pone.0076962
240. Kawahara T, Makizaki Y, Oikawa Y, et al. Oral administration of *Bifidobacterium bifidum* G9-1 alleviates rotavirus gastroenteritis through regulation of intestinal homeostasis by inducing mucosal protective factors. *PLoS One*. 2017;12(3). doi:10.1371/journal.pone.0173979
241. Jounai K, Sugimura T, Morita Y, Ohshio K, Fujiwara D. Administration of *Lactococcus lactis* strain Plasma induces maturation of plasmacytoid dendritic cells and protection from rotavirus infection in suckling mice. *Int Immunopharmacol*. 2018;56. doi:10.1016/j.intimp.2018.01.034
242. Marelli B, Perez AR, Banchio C, de Mendoza D, Magni C. Oral immunization with live *Lactococcus lactis* expressing rotavirus VP8* subunit induces specific immune response in mice. *J Virol Methods*. 2011;175(1). doi:10.1016/j.jviromet.2011.04.011
243. Perez CA, Eichwald C, Burrone O, De Mendoza D. Rotavirus vp7 antigen produced by *Lactococcus lactis* induces neutralizing antibodies in mice. *J Appl Microbiol*. 2005;99(5). doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02709.x
244. Rodríguez-Díaz J, Montava R, Viana R, Buesa J, Pérez-Martínez G, Monedero V. Oral immunization of mice with *Lactococcus lactis* expressing the rotavirus VP8* protein. *Biotechnol Lett*. 2011;33(6). doi:10.1007/s10529-011-0551-6
245. Esteban LE, Temprana CF, Argüelles MH, Glikmann G, Castello AA. Antigenicity and immunogenicity of rotavirus VP6 protein expressed on the surface of *Lactococcus lactis*. *Biomed Res Int*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/298598
246. Temprana CF, Argüelles MH, Gutierrez NM, et al. Rotavirus VP6 protein mucosally delivered by cell wall-derived particles from *Lactococcus lactis* induces protection against infection in a murine model. *PLoS One*. 2018;13(9). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0203700

XI. BIBLIOGRAFÍA

247. Gil MT, Pérez-Arellano I, Buesa J, Pérez-Martínez G. Secretion of the rotavirus VP8* protein in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;203(2). doi:10.1016/S0378-1097(01)00367-6
248. Enouf V, Langella P, Commissaire J, Cohen J, Corthier G. Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(4):1423-1428. doi:10.1128/AEM.67.4.1423-1428.2001
249. Salminen S, Nybom S, Meriluoto J, Collado MC, Vesterlund S, El-Nezami H. Interaction of probiotics and pathogens-benefits to human health? *Curr Opin Biotechnol.* 2010;21(2). doi:10.1016/j.copbio.2010.03.016
250. Klimkaitė L, Ragaišis I, Krasauskas R, Ružauskas M, Sužiedėlienė E, Armalytė J. Novel Antibiotic Resistance Genes Identified by Functional Gene Library Screening in *Stenotrophomonas maltophilia* and *Chryseobacterium* spp. Bacteria of Soil Origin. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7):6037. doi:10.3390/IJMS24076037/S1
251. Cycoń M, Mroziak A, Piotrowska-Seget Z. Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. *Chemosphere.* 2017;172. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.12.129
252. Tian YX, Chen HY, Ma J, Liu QY, Qu YJ, Zhao WH. A critical review on sources and environmental behavior of organophosphorus flame retardants in the soil: Current knowledge and future perspectives. *J Hazard Mater.* 2023;452. doi:10.1016/j.jhazmat.2023.131161
253. Aboubakr HA, El-Banna AA, Youssef MM, Al-Sohaimy SAA, Goyal SM. Antiviral Effects of *Lactococcus lactis* on Feline Calicivirus, A Human Norovirus Surrogate. *Food Environ Virol.* 2014;6(4). doi:10.1007/s12560-014-9164-2
254. Craig K, Dai X, Li A, et al. A lactic acid bacteria (LAB)-based vaccine candidate for Human Norovirus. *Viruses.* 2019;11(3). doi:10.3390/v11030213
255. Thaïs CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature.* 2016;535(7610). doi:10.1038/nature18847

XI. BIBLIOGRAFÍA

256. Abt MC, Osborne LC, Monticelli LA, et al. Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. *Immunity*. 2012;37(1). doi:10.1016/j.immuni.2012.04.011
257. Yaron JR, Ambadapadi S, Zhang L, et al. Immune protection is dependent on the gut microbiome in a lethal mouse gammaherpesviral infection. *Sci Rep*. 2020;10(1). doi:10.1038/s41598-020-59269-9
258. Thackray LB, Handley SA, Gorman MJ, et al. Oral Antibiotic Treatment of Mice Exacerbates the Disease Severity of Multiple Flavivirus Infections. *Cell Rep*. 2018;22(13). doi:10.1016/j.celrep.2018.03.001
259. Zhang Z, Xiang Y, Li N, et al. Protective effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG against human rotavirus-induced diarrhoea in a neonatal mouse model. *Pathog Dis*. 2013;67(3). doi:10.1111/2049-632X.12030
260. Jiang B, Snipes-Magaldi L, Dennehy P, et al. Cytokines as Mediators for or Effectors against Rotavirus Disease in Children. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(6). doi:10.1128/CDLI.10.6.995-1001.2003
261. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(1). doi:10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30
262. Lee CC, Chiu CH, Lee HY, Tsai CN, Chen CL, Chen SY. Clinical and virological characteristics of viral shedding in children with norovirus gastroenteritis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2022;55(6). doi:10.1016/j.jmii.2021.10.006
263. Moral PM, Cabañero-Navalon D, Garcia-Bustos V, Beltrán MN, Lletí MS. Norovirus infection as a model of chronic or recurrent infection in common variable immunodeficiency. *Revista Espanola de Quimioterapia*. 2022;35. doi:10.37201/req/s03.14.2022

XI. BIBLIOGRAFÍA

264. Riller Q, Fourgeaud J, Bruneau J, et al. Late-onset enteric virus infection associated with hepatitis (EVAH) in transplanted SCID patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2023;151(6). doi:10.1016/j.jaci.2022.12.822
265. Mitchell SJ, Scheibye-Knudsen M, Longo DL, De Cabo R. Animal models of aging research: Implications for human aging and age-related diseases. *Annu Rev Anim Biosci*. 2015;3. doi:10.1146/annurev-animal-022114-110829
266. Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2015;282(1821). doi:10.1098/rspb.2014.3085
267. Kadooka Y, Tominari K, Sakai F, Yasui H. Prevention of rotavirus-induced diarrhea by preferential secretion of IgA in breast milk via maternal administration of lactobacillus gasseri SBT2055. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;55(1). doi:10.1097/MPG.0b013e3182533a2b
268. Wen K, Azevedo MSP, Gonzalez A, et al. Toll-like receptor and innate cytokine responses induced by lactobacilli colonization and human rotavirus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;127(3-4). doi:10.1016/j.vetimm.2008.10.322
269. Sekiguchi K, Koba R, Oka T, Tohya Y. Caliciviruses induce mRNA of tumor necrosis factor α via their protease activity. *Virus Res*. 2021;306. doi:10.1016/j.virusres.2021.198595
270. Morgun A, Dzutsev A, Dong X, et al. Uncovering effects of antibiotics on the host and microbiota using transkingdom gene networks. *Gut*. 2015;64(11). doi:10.1136/gutjnl-2014-308820
271. Gopinath S, Kim M V., Rakib T, et al. Topical application of aminoglycoside antibiotics enhances host resistance to viral infections in a microbiota-independent manner. *Nat Microbiol*. 2018;3(5). doi:10.1038/s41564-018-0138-2
272. Yang JH, Bhargava P, McCloskey D, Mao N, Palsson BO, Collins JJ. Antibiotic-Induced Changes to the Host Metabolic Environment Inhibit Drug Efficacy and

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Alter Immune Function. *Cell Host Microbe*. 2017;22(6). doi:10.1016/j.chom.2017.10.020
273. Scott NA, Andrusaite A, Andersen P, et al. Antibiotics induce sustained dysregulation of intestinal T cell immunity by perturbing macrophage homeostasis. *Sci Transl Med*. 2018;10(464). doi:10.1126/scitranslmed.aao4755
274. Woods Acevedo MA, Pfeiffer JK. Microbiota-independent antiviral effects of antibiotics on poliovirus and coxsackievirus: Antiviral Effects of Antibiotics on Enteric Viruses. *Virology*. 2020;546. doi:10.1016/j.virol.2020.04.001
275. Goto Y, Uematsu S, Kiyono H. Epithelial glycosylation in gut homeostasis and inflammation. *Nat Immunol*. 2016;17(11). doi:10.1038/ni.3587
276. Lin B, Saito M, Sakakibara Y, Hayashi Y, Yanagisawa M, Iwamori M. Characterization of three members of murine α 1, 2-fucosyltransferases: Change in the expression of the Se gene in the intestine of mice after administration of microbes. *Arch Biochem Biophys*. 2001;388(2). doi:10.1006/abbi.2001.2303
277. Guo Y, Candelero-Rueda RA, Saif LJ, Vlasova AN. Infection of porcine small intestinal enteroids with human and pig rotavirus A strains reveals contrasting roles for histo-blood group antigens and terminal sialic acids. *PLoS Pathog*. 2021;17(1). doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1009237

XII. APÉNDICE



XI. APÉNDICE

Tabla Ap1. Correlación de Pearson entre los géneros no asociados al título de rotavirus y los mediadores inmunológicos. Se muestra en negrita los valores de correlación fuerte ($r \geq 0,70$). * Valor de significancia de 0,06.

Microorganismo	Mediadores									
	IL1 β	CXCL15 (IL8)	IL10	TNF α	TLR2	INF γ	IL6	IL12	IL4	IL13
<i>Clostridium</i>	0,47	0,52	0,39*	0,82	0,52	0,61				
<i>Dehalobacterium</i>			0,36*	0,70	0,82				-0,49	-0,42
<i>Dorea</i>	0,50	0,50	0,38*	0,82	0,56	0,62				
<i>Coprococcus</i>				0,50	0,77				-0,55	-0,52
<i>Turibacter</i>	0,45	0,50	0,48	0,57	0,50	0,59				
<i>Erwinia</i>		-0,55			-0,48		-0,51	-0,65		0,48
<i>Megasphaera</i>		-0,52			-0,43		-0,62	-0,71		0,38*
<i>Bacteroides</i>		-0,55			-0,44		-0,49	-0,69		0,52
<i>Parabacteroides</i>		-0,44			-0,52	-0,48	-0,45	-0,37		
<i>Mucispirillum</i>				0,43	0,72				-0,58	-0,58
<i>Bilophila</i>				0,48	0,73				-0,60	-0,60

No asociados a la carga viral

XI. APÉNDICE

Tabla Ap2. Correlación de Pearson entre los géneros no asociados al título de norovirus y los mediadores inmunológicos. Se muestra en negrita los valores de correlación fuerte ($r \geq 0,70$).

Microorganismo	Mediadores									
	IL1 β	CXCL15 (IL8)	IL10	TNF α	TLR2	INF γ	IL6	IL12	IL4	IL13
<i>Clostridium</i>		0,45			0,43				-0,60	-0,49
<i>Dehalobacterium</i>					0,45					
<i>Dorea</i>					0,58				-0,54	
<i>Coproccoccus</i>										
<i>Bifidobacterium</i>					0,44					
<i>Odoribacter</i>		0,44		0,64	0,55	0,48			-0,67	-0,40
<i>Adlerkreutzia</i>		0,43		0,46	0,70				-0,70	-0,51
<i>Ruminococcus</i>					0,61				-0,54	-0,48
<i>Turibacter</i>				0,70		0,60			-0,54	-0,50
<i>Allobaculum</i>		0,32			0,54				-0,56	-0,45
<i>Lactobacillus</i>		0,43			0,65				-0,60	-0,41
<i>Streptococcus</i>		0,53								
<i>Erwinia</i>										
<i>Phascolarctobacterium</i>										
<i>Bacteroides</i>										
<i>Proteus</i>		-0,50			0,44				0,42	0,66
<i>Parabacteroides</i>		-0,43							0,48	0,66
<i>Enterobacteriaceae</i>		-0,54					0,48			0,52
<i>Oscillospira</i>					0,44					
<i>Mucispirillum</i>										
<i>Bilophila</i>										
<i>Sutterella</i>		-0,51								
<i>Akkermansia</i>										

No asociados a la carga viral