



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Evaluación de la Infección de Norovirus murino tipo 1 en
linfocitos B esplénicos de ratón”**

T E S I S

Que presenta

QFB. CARLOS ELMILIO MIGUEL RODRÍGUEZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directores de la tesis

Dra. Ana Lorena Gutierrez Escolano

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Ciudad de México

Agosto de 2018

Agradecimientos

A Dios por permitirme continuar con mi formación, por darme sabiduría y fuerzas para continuar siempre.

A CONACYT por la beca otorgada durante los 2 años de estancia en el posgrado.

Al departamento de infectómica y patogénesis molecular, por abrirme las puertas para continuar mi formación académica.

A mis padres por el apoyo y esfuerzos que realizaron para que yo pudiera continuar durante cada etapa de mi formación.

A mi novia Alicia, gracias por tu apoyo incondicional, por prestarme tu hombro cuando lo necesité, por animarme siempre a seguir adelante, por tu amor, por tus consejos, por cada momento feliz a tu lado, gracias por ayudarme a relajarme y continuar. Pero, sobre todo, gracias por tomar mi mano siempre y ayudarme a seguir adelante. Te amo muchísimo.

Dr. Leopoldo Santos Argumedo, gracias por sus consejos, su dirección, por su paciencia, por el tiempo que ha dedicado a mi formación. He aprendido y crecido gracias a usted, pero aún me falta un largo camino por recorrer y sé que con sus consejos creceré aún más.

Dra. Ana Lorena Gutierrez Escolano, gracias por su apoyo en todo momento, por sus consejos, gracias por animarme cuando los experimentos no salían tan bien, gracias por sus observaciones en todo momento y sugerencias, espero poder seguir formándome como un buen investigador con su dirección.

Dr. Héctor Romero Ramírez, por sus consejos, su apoyo en los experimentos y por facilitarme los materiales y reactivos que requería para cada ensayo.

Dra. Clotilde Cancio Lonches, por instruirme pacientemente en la realización de los ensayos con Norovirus y por su apoyo en todo lo relacionado a las líneas celulares.

Al técnico Lenin Estudillo, gracias por tu amistad desde que llegué al laboratorio, por tus consejos tanto en el ámbito personal como en lo académico, gracias por facilitarme todo el material que utilicé durante todos los ensayos.

Al técnico José Luis Chavarría Islas por facilitarme el material necesario en los experimentos de plaqueo viral.

A mis sinodales: Dra. Patricia Talamás Rohana y Dra. Rosa María del Angel. Por sus consejos en la elaboración de este trabajo, por sus correcciones y observaciones.

MVZ Ricardo Gaxiola Centeno y Víctor Manuel García Gómez por su apoyo y asistencia en el manejo de animales de laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio de biomedicina molecular: Zayda, Carolina, David, Daniel, Erick, Alejandra, Victor, Diana, Diego, Miguel, Francisco, Shantal y Orestes. Gracias por cada uno de sus consejos, por animarme, gracias porque he aprendido de cada uno de ustedes.

A mis compañeros de laboratorio de Infectómica: Oscar, Adriana, Adrián, Eduardo, Yoatzin, Alejandro, Melissa, por amabilidad, su apoyo y sus ánimos.

A mis compañeros de maestría: Arely, Carolina, Noé, Adrián, Sarahí, Lizbeth, Elena, Irving, Enrique, Vladimir, Joselin, Edgar y Ricardo. Gracias por su amistad, consejos, por las vivencias y su apoyo en los distintos momentos.

A las secretarías Martha Aguilar, Martha Dueñas, Marcela Guzmán e Irma Miranda. Por su excelente atención en cada uno de los procesos en los que requerí su apoyo.

RESUMEN

Los norovirus humanos, son el agente etiológico principal de la gastroenteritis viral a nivel mundial en las personas de todas las edades; en todo el mundo. Se estima que en países en desarrollo causan aproximadamente 200,000 muertes anuales en niños menores de 5 años. Estos virus, generan un problema económico importante ya que afectan a un gran porcentaje de personas en etapa laboral. Debido a la dificultad de los norovirus humanos para propagarse en cultivos celulares, el norovirus murino (MNV), representa uno de los mejores modelos de estudio para entender la biología molecular y la patogénesis de esta familia viral. Actualmente, no se sabe con exactitud cuál es la célula blanco de estos virus, pero se ha descrito que los norovirus presentan un tropismo por las células del sistema inmunológico como las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B. Algunos autores han descrito la infección por estos virus en líneas celulares de linfocitos B como las células BJAB, las células Wehi-231 y las células M12. Por otro lado, se han reportado algunos de los receptores utilizados por norovirus para entrar a las células que infectan, entre los que se encuentran CD36, CD98, receptor de transferrina (TfR), CD44, CD3001f y CD3001d. Con excepción de CD3001d y CD3001f, todos los demás receptores de norovirus se expresan en linfocitos B. Dado que CD44 se expresa de manera considerable en los linfocitos B, y su expresión puede aumentar de 3 a 10 veces en linfocitos B activados, sería posible pensar que en esas condiciones el norovirus tendría una mayor cantidad de receptores celulares disponibles para su entrada a la célula. Aunque los datos anteriores sugieren que el MNV es capaz de infectar líneas celulares de linfocitos B, hasta ahora no se ha descrito la infección en linfocitos B primarios por estos virus. Por lo que, en el presente trabajo nos propusimos evaluar si los linfocitos B esplénicos de ratones C57BL/6J eran permisivos a la infección con MNV-1, y si la activación celular, así como el aumento en la

expresión de CD44 favorecían la infección de MNV-1 a los linfocitos B. Encontramos que efectivamente los linfocitos B esplénicos son permisivos a la infección con MNV-1 y que esta infección se ve favorecida con su activación. Por último, encontramos que el aumento de CD44 en la membrana del linfocito B puede favorecer la entrada de MNV-1 a la célula.

ABSTRACT

Human noroviruses are the main etiological agent of viral gastroenteritis worldwide in people of all ages, causing approximately 200,000 deaths annually in children under 5 years of age in developing countries. In addition to the high costs generated by this virus to affect people in labor stage. Due to the difficulty of human noroviruses to grow in cell cultures; Murine norovirus (MNV), represents the best model to understand the molecular biology and pathogenesis of this viral family. Currently, it is not known with certainty which is the virus-cell target, but it has been described that noroviruses have a tropism for the immune system cells, such as dendritic cells, macrophages and B cells. Some authors have described the infection of norovirus in B-cell lines such as BJAB, Wehi-231, and M12. Some of the receptors used for norovirus to enter cells have also been found, such as CD36, CD98, transferrin receptor (TfR), CD44, CD3001f, and CD3001d. With the exception of CD3001d and CD3001f, all other norovirus receptors are expressed in B lymphocytes. CD44 is highly expressed in a considerable manner in B lymphocytes and its expression can increase 3 to 10 fold in activated B lymphocytes, thus allowing the norovirus have a greater number of cell available for entry into the cell. These data suggest that MNV is able to infect B lymphocyte cell lines, but infection of primary B lymphocytes with this viruses has not yet been described. Infection of primary b cells may provide better information about the interaction of MNV-1 with the cells of the inmune system of the host. Thus, in this work we evaluated whether the splenic B lymphocytes of C57BL / 6J mice were permissive to infection with MNV-1, and if an increase in the expression of CD44 favored the infection of MNV.1 We found that splenic B cells are permissive to infection with MNV-1 and that this infection is favored with the

activation of lymphocytes. Finally, we found that the increase of CD44 in the lymphocyte membrane favours MNV-1 entry to the cell.

Índice

Resumen	4
Abstract.....	5
Índice	6
Índice de figuras.....	8
Introducción	9
Generalidades de <i>Norovirus</i>	9
Biología de los <i>Norovirus</i>	9
Proteínas de <i>Norovirus</i>	10
Clasificación de los <i>Norovirus</i>	14
Epidemiología de <i>Norovirus</i>	15
Patogénesis de los <i>Norovirus</i>	16
Marco teórico	19
Tropismo de <i>Norovirus</i> por las células del sistema inmunológico	20
<i>Norovirus</i> infecta linfocitos B	21
Receptores celulares de <i>Norovirus</i> presentes en los linfocitos B	22
Justificación	24
Hipótesis	24
Objetivo General.....	25
Objetivos Particulares.....	25
Metodología	26
Aislamiento de células mononucleares.....	26
Enriquecimiento de linfocitos B.....	26

Bloqueo de CD44 con el anticuerpo IM-7	27
Infección con <i>Norovirus</i>	27
Obtención de proteínas de lisado celular.....	27
Ensayo de “Western Blot”	28
Ensayo de Plaqueo.....	28
Resultados.....	30
Activación de linfocitos B y expresión de CD44.....	32
Resultados de Objetivo 1.....	33
Resultados Objetivo 2.....	35
Resultados objetivo 3	38
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	42
PERSPECTIVAS	42
BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Genoma y proteínas de norovirus.....	10
Figura 2 Estructura de la cápside de MNV-1.	13
Figura 3 Mapa de clasificación de los norovirus (Vinjé, 2015).	15
Figura 4 Diluciones seriadas de los sobrenadantes de linfocitos B infectados para la realización del ensayo de plaqueo en células Raw 264.7.....	29
Figura 5 Diagrama de ensayo de plaqueo en células Raw 264.7.....	30
Figura 6 Citometría de flujo del enriquecimiento de linfocitos B mediante panning con anti-CD90.....	31
Figura 7 Expresión de CD44 en linfocitos B estimulados y no estimulados..	32
Figura 8. “Western blot” de la infección de MNV-1 en linfocitos B	333334
Figura 9 Ensayo de plaqueo de sobrenadante de linfocitos B infectados con MNV-1.....	35
Figura 10 “Western blot” de la infección de MNV-1 en linfocitos B estimulados respecto a los no estimulados.....	37
Figura 11 Ensayo de plaqueo de sobrenadantes de linfocitos B estimulados y no estimulados infectados con MNV-1.....	38

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES DE *NOROVIRUS*.

La gastroenteritis es un conjunto de trastornos producidos por la inflamación de la mucosa gástrica e intestinal, cuyo síntoma principal es la diarrea (Moncayo Posligua, 2017). Este padecimiento se genera a partir de una infección aguda causada por bacterias, parásitos o virus (Cortina & Gutiérrez, 2009). Los norovirus humanos son el principal agente etiológico de gastroenteritis viral a nivel mundial en las personas de todas las edades; estas infecciones causan aproximadamente 200,000 muertes anuales en niños menores de 5 años en países en desarrollo, tienen un costo sanitario directo de 4 mil millones de dólares y aproximadamente 60 mil millones de dólares en costos indirectos en todo el mundo (Bartnicki, et al, 2017). La mayoría de las infecciones son causadas por el Genogrupo 2, genotipo 4 (GII.4) (Bartnicki et al., 2017; Vega et al., 2014). Uno de los mayores impedimentos en el avance del estudio de los norovirus que infectan a humanos, es su dificultad para propagarse en cultivos celulares. El norovirus murino (MNV), puede propagarse en macrófagos, por lo tanto, representa uno de los mejores modelos de estudio para entender la biología molecular y la patogénesis de esta familia viral (Bartnicki et al., 2017; Taube et al., 2013).

Biología de los *Norovirus*.

Los norovirus pertenecen a la familia *Caliciviridae*, son virus no envueltos, que se dividen en siete genogrupos con más de 30 genotipos. Estos virus tienen un genoma de RNA monocatenario de sentido positivo, y un tamaño de aproximadamente 7.7 Kb, que posee normalmente 3 marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican a todas las proteínas virales. El ORF1 codifica para una poliproteína que se auto procesa de manera co-traduccional y post-traduccional generando 7 proteínas no estructurales maduras (NS1-NS7) las cuales están implicadas en la replicación del virus (Bartnicki et al., 2017; Glass, Parashar, & Estes, 2009). El ORF2 codifica para la proteína mayoritaria o

principal de la cápside (VP1), la cual se ensambla en forma de dímeros y 90 copias de estos dímeros conforman la cápside viral. La proteína VP1 presenta dos dominios: el dominio de la cubierta (S), que encierra el RNA viral, y el dominio saliente o externo (P), el cual interactúa con los receptores de membrana; este dominio P evoluciona ante la presión de selección del sistema inmunológico (Hardy, 2005; Cunha & Wobus, 2016).

El ORF3 codifica para la proteína minoritaria de la cápside (VP2), de la cual solo se encuentran de 2 a 3 copias por virion (Cunha & Wobus 2016). Adicionalmente, los norovirus murinos poseen un cuarto marco de lectura, el cual codifica un factor de virulencia (VF1) (Hardy, 2005; McFadden et al., 2011).

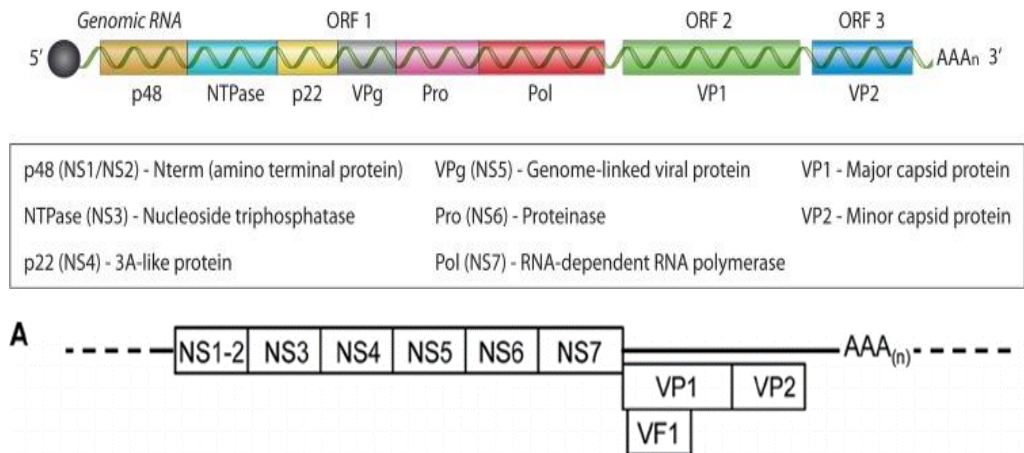


Figura 1 Genoma y proteínas de norovirus

Proteínas de *Norovirus*

P48 (NS1/NS2)

Esta proteína es de secuencia variable dependiendo del genogrupo de norovirus, pero su secuencia es más conservada hacia el extremo carboxilo de la proteína. En algunos calicivirus, como el calicivirus felino (FCV) la proteína NS1/2 presenta un sitio de escisión que genera 2 proteínas de aproximadamente 15 y 22 kDa, de las que no se conoce completamente su

función, pero se cree que participan durante el proceso de replicación viral. Para el caso particular del MNV, el precursor NS1/NS2 puede ser cortado por caspasas, aunque en general la proteína se mantiene como una sola. NS1/2 se localiza en retículo endoplásmico alterando la forma y distribución de este organelo, en contraste con su homólogo P48 del virus humano de Norwalk que se localizan en la membrana del aparato de Golgi e induce el rearrreglo de la membrana de este organelo (Karst, 2010). NS1/2 interactúa además con el complejo regulador SNARE VAP-A regulando el tráfico vesicular y puede inhibir la presentación de proteínas en la superficie. La proteína P48 forma un complejo con el regulador SNARE y VAP-A y previene la expresión en la superficie de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (Hardy, 2005; Karst, 2010).

NTPasa (NS3)

Esta proteína se une al ATP y lo hidroliza generando energía. Al sobre expresar NS3, esta se localizó en estructuras similares a vesículas en el citoplasma, además se presentaron marcas dispersas en el citoplasma, pero estas estructuras similares a vesículas no se encontraron en células infectadas por el virus, lo que puede indicar que su formación depende del grado de expresión de la proteína. (Hardy, 2005)

P22 (NS4)

También llamada proteína tipo 3A, debido a que en el genoma de norovirus ocupa una posición similar a la posición de la proteína 3A de picornavirus. En células transfectadas induce la alteración del aparato de Golgi; además, NS4 contiene una nueva señal de exportación de retículo endoplásmico que da como resultado un tráfico aberrante de vesículas recubiertas con COPII y, en última instancia, en la inhibición de la secreción de proteína del huésped. NS4 contribuye también, a la formación de los complejos de replicación viral en las membranas intracelulares. Se sugiere que puede jugar un papel importante en la patogénesis de la infección al evitar la expresión de moléculas de superficie. (Hardy, 2005; Karst, 2010).

VPg (NS5)

Presenta un peso aproximado de 15 kDa, y está unida covalentemente al extremo 5' del RNA viral. Su principal función es la regulación de la traducción viral. VPg interacciona con factores del inicio de la traducción, y promueve el reclutamiento del ribosoma, por lo que se le considera como un cap proteináceo. Además, VPg puede sufrir un proceso de uridililación que le permite funcionar como un cebador para la replicación del RNA viral. (Hardy, 2005; Karst, 2010).

Proteasa (NS6)

Es la única proteasa codificada por el virus, con un peso aproximado de 19 kDa; esta proteína es la encargada de escindir a la poliproteína codificada por el ORF-1 y dar lugar a las proteínas no estructurales maduras. Se ha observado que su localización es en el citoplasma y en las mitocondrias celulares, además se sabe que, en algunos virus de la familia, esta proteína se encuentra siempre asociada con la replicasa viral, como NS6/7. Sin embargo, en el caso del MNV, este precursor puede también ser procesado para producir a ambas proteínas de manera individual. (Hardy, 2005; Hardy, Crone, Brower, & Ettayebi, 2002; Karst, 2010).

RNA polimerasa dependiente de RNA (NS7 ó RdRp)

Es la encargada de replicar el genoma viral a partir del intermediario replicativo de RNA de polaridad negativa, tiene un peso aproximado de 57 kDa, se encuentra de manera difusa en el citoplasma y también en el núcleo (Hyde, 2010), puede estar en asociación con NS6 y este precursor es capaz de llevar a cabo tanto la función de proteasa como la de polimerasa, por lo que ambas proteínas están involucradas en el proceso de replicación del RNA viral (Hardy, 2005; Karst, 2010; Ng et al., 2004).

VP1

Esta es la proteína mayoritaria de la cápside, con un tamaño entre 530 y 555 aminoácidos, y un peso molecular entre 58-60 kDa. Esta proteína es capaz de autoensamblarse en 90 dímeros que forman las cápsides virales. Presenta 3 dominios: S, P1 y P2. El dominio S o de cubierta, contiene los elementos esenciales para la formación de la cápside icosaédrica del virus, por otra parte, el dominio P se divide en 2 regiones P1 y P2, estos dominios P interactúan en contactos diméricos, que aumentan la estabilidad de la cápside. La región P2 tiene un tamaño aproximado de 127 a.a., ésta es una región hipervariable que le confiere al virus la capacidad de unirse a distintos receptores, y es la principal responsable de las interacciones de antígenos del grupo histosanguíneo ABO, asociadas con la susceptibilidad a infecciones por norovirus. También, es con base en la variabilidad de la región P2 de la proteína VP1, que se clasifican los norovirus en distintos genogrupos y genotipos (Bartnicki et al., 2017; Hardy, 2005)

VP2

VP2 es la proteína minoritaria de la cápside, esta proteína es codificada por el marco de lectura 3, mediante un mecanismo de reiniciación dependiente de terminación. Tiene un tamaño aproximado de entre 208 y 268 aminoácidos y un peso de 22-29 kDa. El virión de norovirus contiene de 2 a 3 copias de VP2, y se cree que esta proteína, podría estar participando en estabilizar al virión de norovirus en condiciones de pH alcalino. (Hardy, 2005)

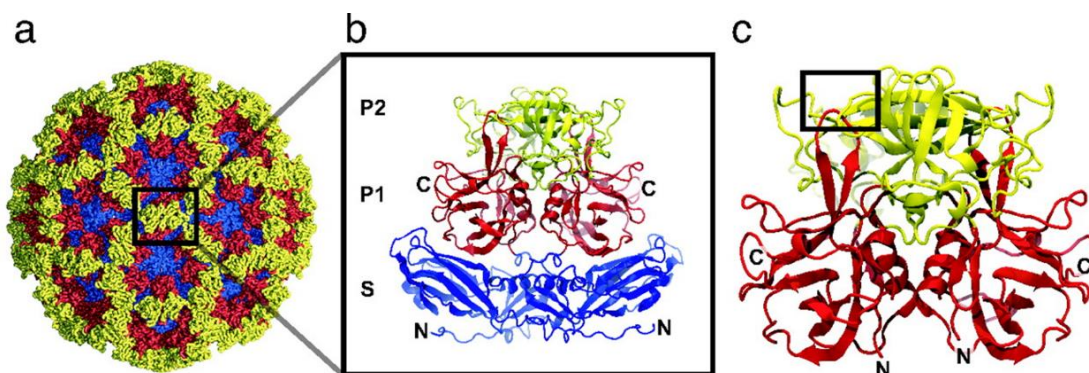


Figura 2 Estructura de la cápside de MNV-1.

VF1

Esta proteína, únicamente se ha descrito en el MNV y esta codificada en el cuarto marco de lectura (ORF4) que se sobre lapa con el de la proteína mayoritaria de la cápside (Mc Fadden, 2011). Este factor de virulencia permite al norovirus establecer una infección eficiente en su huésped natural, al interferir con las vías de respuesta mediadas por interferón y la apoptosis. Esta proteína es la encargada de modular la respuesta del huésped a la infección (Hardy, 2005; McFadden et al., 2011).

Clasificación de los *Norovirus*

El norovirus humano, anteriormente conocido como virus Norwalk, fue el primer agente viral que se identificó como causante de gastroenteritis en un brote de gastroenteritis en una escuela primaria en Norwalk, Ohio, EUA en 1972 (Vinjé, 2015). Los norovirus humanos son genéticamente y antigénicamente diversos, por tanto su clasificación ha sido siempre debatida; en un principio la clasificación de los norovirus se basó en estudios de análisis de reactividad cruzada y mediante microscopía electrónica, posteriormente, la secuenciación genómica y la RT-PCR se convirtieron en la principal herramienta para la caracterización de los virus y entender la relación entre las diferentes cepas, pero debido a que las variaciones de secuencia son limitadas, algunas cepas no podían ser clasificadas o diferenciadas adecuadamente (Bartnicki et al., 2017; Vinjé, 2015). Actualmente los norovirus se clasifican en 7 genogrupos con más de 30 genotipos, esto basado en un sistema de clasificación dual, usando la diversidad de aminoácidos en la proteína VP1 y la región de la RNA polimerasa del ORF1, este sistema dual se sugirió debido a que la recombinación en la región de unión del marco de lectura 1 y el marco de lectura 2 es algo común, y algunos genotipos de cápside parecen ser más propensos a la recombinación que otros (Bartnicki et al., 2017; Vinjé, 2015)

Finalmente, el consenso actual para la clasificación de norovirus se apoya en criptogramas, y debe incluir el nombre del organismo, huésped principal,

código del país donde se detectó la cepa, año de detección, genogrupo, genotipo, nombre de la variante y la ciudad en caso de ser necesaria (seguida por un número de serie)(Bartnicki et al., 2017).

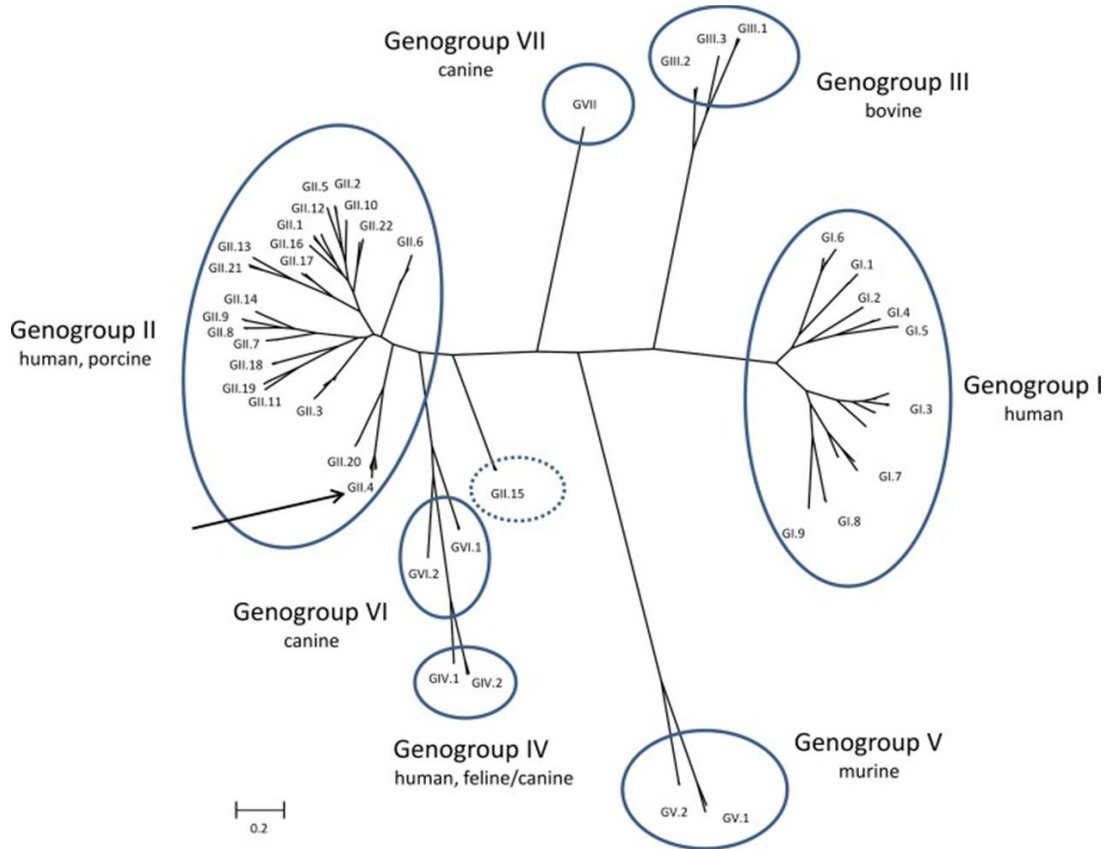


Figura 3 Mapa de clasificación de los norovirus (Vinjé, 2015).

Epidemiología de *Norovirus*

Los norovirus son la principal causa de gastroenteritis no bacteriana a nivel mundial. Los brotes de norovirus ocurren principalmente en las épocas de invierno, lo que explica por qué se le conoce como la enfermedad del vómito de invierno, estos brotes ocurren principalmente en comunidades semicerradas, tales como escuelas, asilos de ancianos, cruceros y hospitales. Los brotes ocurren de forma repentina, esto probablemente debido a la alta infectividad de las partículas virales y por tanto, a la cantidad tan pequeña de

inóculo necesario para desarrollar los síntomas (menor a 100 partículas virales), además de que sus partículas virales son muy estables en el medio ambiente (Bartnicki et al., 2017; Franck, Fonager, Ersbøll, & Böttiger, 2014). En 2002 se presentó un aumento en los brotes de norovirus en todo el mundo, esto se relacionó con la aparición de una nueva cepa de norovirus, la cepa GII.4. Las variantes de esta cepa han sido las causantes de los principales brotes de norovirus, y se cree que actualmente representan aproximadamente el 80% de todos los brotes de norovirus. No se sabe con exactitud por que la cepa de norovirus GII.4 es tan predominante, pero es probable que esto se deba a una mayor estabilidad ambiental, una mayor transmisibilidad de esta cepa o una mayor virulencia (Bartnicki et al., 2017; Franck et al., 2014).

Patogénesis de los *Norovirus*

- Enfermedad clínica:

Norovirus tiene un periodo de incubación de 24 a 48 horas y los síntomas se resuelven entre las 12 a 72 horas posteriores al establecimiento de la infección; los principales síntomas son vómitos y diarrea con o sin náuseas, así como calambres abdominales, causando un episodio agudo de gastroenteritis. Existen grupos de riesgo específico que pueden presentar una gastroenteritis grave como los bebés y niños pequeños con síntomas que pueden durar hasta 6 semanas. Existen reportes de pacientes inmunocomprometidos que presentan síntomas que duran más de 2 años y en ancianos puede llegar a ser letal (Karst, 2010; Karst & Tibbetts, 2016).

- Alteraciones histológicas del intestino

Debido a la falta de un sistema de cultivo celular, y de modelos animales para la infección de norovirus humano, la mayoría de los datos recopilados sobre la fisiopatología del virus provienen de estudios físicos, histológicos y bioquímicos de voluntarios humanos infectados, así como de estudios realizados utilizando al MNV como modelo para comprender la interacción de

estos virus con los componentes del huésped (Bartnicki et al., 2017; Karst, 2010; Karst & Tibbetts, 2016).

El análisis histológico de muestras de biopsias del intestino proximal de voluntarios humanos, que se enferman después de la administración de norovirus GI (Norwalk; GI.1) o GII (Hawái; GII.1), mostraron que la mucosa intestinal estaba intacta, pero con ensanchamiento y acortamiento de las microvellosidades, mitocondrias agrandadas y pálidas, además de aumento de la vacuolización citoplásmica y edema intercelular, a pesar de esto, los análisis de microscopía electrónica mostraron que las células están intactas (Karst, 2010; Karst & Tibbetts, 2016). Se ha reportado también que existe hiperplasia en las células de las criptas después de la infección por norovirus (Karst & Tibbetts, 2016). Además, también se ha observado una leve infiltración inflamatoria en la lámina propia en humanos infectados con virus Norwalk, así como en terneros gnotobióticos y ratones infectados con MNV-1. También hay aumento en el número de células T citotóxicas intraepiteliales, localizadas en el duodeno de pacientes infectados por norovirus, de 0-6 días después del inicio de los síntomas. Todos estos cambios en la arquitectura del tracto gastrointestinal, se observan durante el tiempo de la enfermedad por norovirus, pero se resuelven por completo en un par de semanas. (Karst & Tibbetts, 2016; Lay et al., 2010)

Se ha demostrado que los *calicivirus* inducen apoptosis y se ha sugerido que esto ocurre como un mecanismo para su dispersión en el hospedero. Las estrategias de cómo se induce la apoptosis son distintas para cada virus de la familia. En el caso del MNV la apoptosis se regula por el factor de virulencia codificado por el marco de lectura 4 de norovirus murino (VF1), se ha demostrado que VF1 participa retardando la apoptosis de las células infectadas por MNV, permitiendo una mayor replicación del virus dentro de la célula. También, este factor de virulencia, antagoniza la respuesta inmune innata a la infección al retrasar la expresión de varios genes celulares activados por la vía innata (McFadden et al., 2011).

Infección sistémica

Durante mucho tiempo se consideró que la infección por norovirus está confinada al intestino, pero varios estudios apuntan a que esto no es así, se ha encontrado RNA de norovirus en el suero del 15% de individuos infectados, además en modelos animales se ha detectado viremia transitoria en el 50% de cerdos gnotobióticos infectados con Hs66. También se sabe que los MNV se diseminan a los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) que drenan el intestino, así como a tejidos periféricos (Karst, 2010; Souza, Azevedo, Jung, Cheetham, & Saif, 2008). Se ha encontrado también presencia de partículas virales en el bazo de ratones deficientes de STAT-1, así como de ratones inmunocompetentes. Además, se observaron cambios histológicos esplénicos específicos, como la activación de las células en la pulpa blanca y la hipertrofia de las células en la pulpa roja. No se conoce el mecanismo por el cual los norovirus se diseminan, pero se sugiere que, al infectar a las células dendríticas, éstas migran de los tejidos al drenaje linfático facilitando así la diseminación extraintestinal (Karst, 2010).

La diseminación de los norovirus a sitios periféricos es clínicamente relevante porque se pueden estar pasando por alto patologías leves asociadas con la infección por norovirus humano, de hecho, se han descrito asociaciones de infecciones por norovirus con patologías extraintestinales como encefalopatías, coagulación intravascular diseminada y convulsiones infantiles benignas (Hardy, 2005; Souza et al., 2008).

Manifestaciones bioquímicas

La infección por norovirus causa un marcado retraso en el vaciamiento gástrico, esto se relaciona con la alta incidencia de episodios de vómitos durante las infecciones por norovirus. Esto puede ser causado por alteraciones en las funciones motoras gástricas o la inflamación de la unión pilórica en el estómago y el intestino (Karst & Tibbetts, 2016). En ratones STAT1^{-/-} se ha observado una distensión gástrica considerable tras la infección por MNV-1. Además se sabe que norovirus produce una malabsorción transitoria de

moléculas como D-xilosa, grasa y lactosa durante la infección aguda por norovirus, esto puede ser generado por el acortamiento de las microvellosidades, así como la actividad disminuida de las enzimas específicas del borde en cepillo de los enterocitos, como son: fosfatasa alcalina, sacarasa, trehalasa y posiblemente lactasa (Hardy et al., 2002; Karst, 2010).

MARCO TEÓRICO

Norovirus Murino como modelo de estudio

Han transcurrido 46 años desde que se identificó el virus Norwalk en un brote de gastroenteritis en Ohio, EUA, y aún en la actualidad no se cuenta con una vacuna para tratar o prevenir la infección con norovirus. El principal retraso en el conocimiento de la biología de los norovirus que infectan a humanos, ha sido la dificultad para propagarse en cultivos celulares y en modelos animales (Adler & Zickl, 1969; Bartnicki et al., 2017). Muchos grupos de trabajo han logrado identificar diferentes tipos de norovirus en varias especies animales como los cerdos y las vacas, pero fue hasta en el año 2003 con el descubrimiento del MNV, que se logró establecer un modelo animal adecuado, que ha permitido un avance significativo en el conocimiento de la biología celular y la patogenia de estos virus (C Hsu, Riley, Wills, & Livingston, 2006; Wobus, Thackray, & Virgin, 2006). En el año 2003 ratones severamente inmunocomprometidos, que carecían del gen activador de la recombinación 2 (RAG2) y del transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT-1) (ratones RAG2 / STAT1 - / -), esporádicamente sucumbían a una enfermedad sistémica que podría transferirse en serie por vía intracerebral (Ic), lo que sugería que esto era causado por un patógeno. Este patógeno también fue inoculado a ratones inmunocompetentes y se determinó que en estos

causaban una infección gastrointestinal asintomática, pero se desconocía la naturaleza de este agente infeccioso. Al continuar con estos estudios, encontraron que este patógeno presentaba las características de un virus ya que podía filtrarse a través de un filtro de 0,22 μm y era sensible al interferón (IFN) (Hsu et al., 2016; Charlie C Hsu et al., 2006). Al realizar un análisis de secuencias genómicas encontraron que el agente de interés presentaba secuencias similares a la de los norovirus descritos anteriormente. A partir de ese momento se comenzó a estudiar y caracterizar este virus. El descubrimiento del MNV generó un gran avance en el estudio de la biología y la patogenia de los norovirus, esto debido principalmente a su facilidad de propagarse en cultivos celulares y en el ratón. Uno de los principales logros del uso de este modelo es que se descubrió que este virus infecta a más de un tipo celular, pero se ha destacado principalmente su tropismo por las células del sistema inmunológico (Doom, Turula, & Hill, 2009).

Tropismo de *Norovirus* por las células del sistema inmunológico

Los norovirus son virus entéricos, por lo que en un principio se analizó el tracto gastrointestinal en busca de células blanco. Se sabe que los norovirus tienden a afectar el tracto intestinal superior (duodeno y yeyuno) modificando la estructura de las microvellosidades, se ha reportado además que las células epiteliales intestinales infectadas por norovirus exhiben un efecto citopático (Bartnicki et al., 2017). Pero también es bien conocido que norovirus no solo afecta enterocitos, sino que afecta distintos tipos celulares cercanos o no al tracto intestinal, principalmente teniendo predilección por células del sistema inmunológico. De hecho, el primer sistema de cultivo para un norovirus fue el del MNV en macrófagos y células dendríticas de ratón. Adicionalmente, en otro estudio, se reportó la presencia de RNA viral en el ganglio mesentérico y bazo después de 5 semanas de infección en ratones juveniles CD1 (Karst, 2010). En 2016 se detectó la presencia de norovirus humano en secciones de intestino delgado inmunoteñidas, que provenían de pacientes infectados con norovirus humano. En estos cortes algunas de las células que presentaban marca de

proteínas de norovirus, además de los enterocitos, fueron los macrófagos, células dendríticas y las células CD3 positivas. Desafortunadamente, en este estudio no se pudo abordar la infección de las células B, porque la marca de CD20+ no fue detectable en las muestras. Por último, también se ha reportado la presencia de la proteína de cápside de MNV en células de la lámina propia. Lo anterior corrobora que los norovirus no afectan solamente un tipo celular, y es necesario analizar con mayor detalle el papel de cada tipo celular durante la infección con norovirus (Blacklow et al., 1972; Karst, 2010; Schreiber, Blacklow, & Trier, 1974).

Norovirus infecta linfocitos B

La respuesta inmune adaptativa es importante para contener y eliminar la infección por MNV-1, específicamente los linfocitos B y T. Jones y colaboradores, en 2014, demostraron que las líneas celulares de linfocitos B (M-12 y WEHI-231), son susceptibles a la infección tanto de MNV como norovirus humano y que esta infección se ve promovida ante la presencia de carbohidratos como los antígenos de grupo sanguíneo (HBGA); los cuales pueden estar solubles o pueden ser expresados por algunas bacterias entéricas (Jones et al., 2015; Newman & Leon, 2015). Además otras líneas celulares de linfocitos B como las Raji y Namalwa, pueden ser infectadas por la cepa de norovirus humanos (GII.4 Sydney), aunque en menor medida que las células BJAB (Jones et al., 2015). Otro hallazgo importante es que pacientes con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), que carecen de células B, pueden ser infectados con norovirus humano, pero el título viral de estos pacientes fue aproximadamente un logaritmo más bajo en comparación con los pacientes con células B, lo que nos confirma nuevamente que norovirus tiene tropismo por distintos tipos celulares, pero también sugiere que los linfocitos B contribuyen de manera notoria a los títulos virales generales (Brown, Gilmour, & Breuer, 2016).

Receptores celulares de *Norovirus* presentes en los linfocitos B

Los principales receptores de unión para la mayoría de los norovirus humanos son los antígenos del grupo histo-sanguíneo (HBGA)(Tan & Jiang, 2011), los cuales son carbohidratos complejos terminales de las cadenas de glicanos ligadas a lípidos o proteínas, expresados por diferentes células como las células epiteliales intestinales, aunque también pueden ser secretados en fluidos como la saliva o pueden ser expresados por bacterias comensales. Otros receptores como CD36, CD98, receptor de transferrina y CD44 son moduladores específicos de la infección por MNV en macrófagos murinos y células dendríticas murinas, por último 2 receptores de la familia CD300: CD300lf y CD300ld se identificaron como los principales receptores de entrada de norovirus murino (Haga, 2016; Orchard, 2016), la transfección de CD300lf murino o CD300ld en líneas celulares humanas HeLa y HEK293T no susceptibles pero permisivas convirtió a estas células en susceptibles a la infección por norovirus murino; sin embargo, la transfección de CD300lf humano en células murinas no medió la susceptibilidad del MNV, siendo estos receptores los que determinan tanto el tropismo celular como la barrera de especies (Bartnicki et al., 2017).

De los receptores mencionados anteriormente se sabe que los linfocitos B expresan CD36, CD98, TfR y CD44 (Cunha & Wobus, 2016). En el caso de los receptores pertenecientes a la familia de CD300 no existen reportes de su expresión en linfocitos B, aunque en la base de datos de "Genecard" se indica que CD300lf pudiera expresarse en linfocitos B. La posible falta de los receptores CD300ld y CD300lf puede ser la razón por la cual, los linfocitos B se infecten mucho menos que las células dendríticas y los macrófagos que si expresan esos receptores. Por otra parte, esto también indica que, ante la posible ausencia de estos receptores, los receptores restantes y/o algún otro receptor aun no descrito pudiera estar llevando a cabo el papel principal de receptor de entrada para norovirus murino en linfocitos B.

CD36

También conocido como glicoproteína plaquetaria 4. Es la cuarta glicoproteína principal de la superficie de las plaquetas y sirve como un receptor para la trombospondina en plaquetas y diversas líneas celulares, es una translocasa de ácidos grasos y pertenece a los receptores de tipo scavenger clase B miembro 3 (SCARB3). Esta proteína puede tener funciones importantes como molécula de adhesión celular. Se une al colágeno, a la trombospondina, a los fosfolípidos aniónicos y al LDL oxidado. En 2016 Juliana Bragazzi Cunha y Christiane E. Wobus encontraron que al infectar células dendríticas provenientes de medula ósea de ratones deficientes de CD36 la unión de MNV-1 a la célula se redujo un 22% (Cunha & Wobus, 2016).

CD98

Es una glicoproteína heterodimérica que forma el transportador grande de aminoácidos neutros (LAT1). Este receptor media señales adhesivas que controlan la diseminación, supervivencia y crecimiento celular. Se ha demostrado mediante ensayos de silenciamiento con siRNA, dirigidos contra el gen de CD98, que en las células transfectadas con el siRNA, la unión del virus a la célula se disminuyó en un 33% comparado con las células control (Cunha & Wobus, 2016).

TfR

Es la proteína encargada del importe de hierro a la célula, para esto la transferrina se une al hierro, este complejo es reconocido por el receptor de transferrina y se importa a la célula mediante endocitosis mediada por receptor. En estudios realizados por Cunha y Wobus en 2016 observaron que al silenciar mediante siRNA la expresión de TfR, en macrófagos Raw 264.7, la unión de MNV-1 a las células se disminuía en un 37% (Cunha & Wobus, 2016).

CD44

Es un receptor de adhesión de la superficie celular que se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer, participa en procesos de migración y adhesión

celular, y su ligando es el ácido hialurónico. Se expresa de manera ubicua en todo el cuerpo y tiene un peso molecular de 85-200 kDa; dependiendo de la isoforma de CD44, existen aproximadamente 20 isoformas las cuales se generan mediante splicing alternativo. En el linfocito B se expresa la isoforma estándar de CD44 (CD44e). Se han realizado ensayos de unión de partículas virales a células dendríticas provenientes de médula ósea de ratones deficientes de CD44 y se ha observado una disminución del 50% de la unión del virus comparado con el control de fenotipo silvestre (Cunha & Wobus, 2016).

JUSTIFICACIÓN

Los norovirus presentan un tropismo por las células del sistema inmunológico como las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B. En la literatura se ha observado que los norovirus pueden infectar algunas líneas celulares de linfocitos B como BJAB, M12 y WEHI-231, pero hasta ahora no se ha descrito la infección en linfocitos B primarios. Los receptores CD3001d y CD3001f que se han descrito como las principales moléculas que median la entrada de los MNV a la célula, no se expresan en linfocitos B, por lo tanto, es posible que otros receptores como CD44 puedan estar participando durante su proceso de entrada a las células B. CD44 es una molécula implicada en procesos como proliferación y activación de linfocitos B, y su expresión aumenta hasta 10 veces más en linfocitos B activados. Es por ello, que resulta importante evaluar si los linfocitos B, provenientes de bazo de ratón, son susceptibles a la infección con MNV-1 y si CD44 participa en la entrada del MNV en las células B.

HIPÓTESIS

Los linfocitos B provenientes del bazo de ratones C57BL6/J son susceptibles a la infección con norovirus murino tipo I.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la infección de MNV-1 en linfocitos B.

Objetivos Particulares

- Evaluar si los cultivos primarios de linfocitos B esplénicos son susceptibles a la infección por MNV-1.
- Evaluar si la activación de los linfocitos B favorece la infección con MNV-1
- Analizar el efecto del bloqueo de CD44 en la infección con MNV-1 en los linfocitos B esplénicos de ratón.

METODOLOGÍA

Aislamiento de células mononucleares

Se sacrificaron ratones C57BL/6J de 6-8 semanas de edad y se les extrajo el bazo; posteriormente, se disgregó suavemente en una caja Petri, con 11 ml de PBS estéril con ayuda de una malla metálica y un embolo de jeringa. A continuación, se separaron las células mononucleares mediante un gradiente de "Ficoll-Hypaque". Para ello, en un tubo cónico de 15 ml se colocaron 5 ml de "Ficoll-Hypaque" y después se agregó muy suavemente la suspensión de células de bazo, teniendo precaución de no romper la tensión superficial del "Ficoll". Una vez preparado el gradiente, se centrifugó a 400 gravedades (xg) durante 30 min a 25 °C y sin aceleración ni desaceleración de la centrifuga. Después de la centrifugación, se aisló el anillo de células mononucleares con ayuda de una micropipeta de 1000 µL. Las células se lavaron con 3 ml de PBS estéril y centrifugando a 400 x g, 5 min, seguido de esto, se lisaron los eritrocitos que contenía el botón de células, para lo cual se agregó 1 ml de buffer de lisis de eritrocitos 1X (NH₄Cl 155 mM, NaHCO₃ 1mM, EDTA 0.1 mM), se mezcló la suspensión celular y se incubó durante 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 4 ml de PBS estéril y se centrifugó a 400 x g, durante 5 min.

Enriquecimiento de linfocitos B

Las células mononucleares obtenidas se sometieron a una selección negativa mediante "panning" utilizando líquido de ascitis que contenía el anticuerpo Thy 1.1 (anti-CD90 dilución 1:1000). Para esto, el día anterior al sacrificio de ratones se preparó una caja Petri de plástico con 10 ml de PBS y 10 µL de ascitis con Thy 1.1, y se incubó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se retiró el sobrenadante y se agregaron las células mononucleares obtenidas de 2 bazos de ratón resuspendidas en 5 ml de PBS, y se incubó durante 1 h a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante en el cual se encontraban los linfocitos B, esto debido a que los linfocitos B no expresan CD90 y por tanto no se adhieren al anticuerpo de la caja Petri. Por último, se

contaron los linfocitos obtenidos mediante cámara de Neubauer y azul de tripano. De los linfocitos B que se obtuvieron, se activó la mitad con LPS + IL-4 durante 48 h (10 µg de LPS + 10 ng de IL-4 por mililitro de medio RPMI suplementado al 10 % de suero fetal bovino), a las células restantes solo se les agregó medio RPMI suplementado al 10 % con suero fetal bovino.

Bloqueo de CD44 con el anticuerpo IM-7

Para realizar el bloqueo de los receptores celulares CD44, se incubaron 2 millones de linfocitos B con 600 µL de sobrenadante de cultivo celular proveniente de la clona IM-7 que contenía anti-CD44. Las células se incubaron durante 30 min a 37 °C y posteriormente se centrifugaron los linfocitos B a 400 x g durante 5 min a 25 °C y se decantó el sobrenadante.

Infección con *Norovirus*

Dos millones de linfocitos B activados o no activados se suspendieron por separado en 1 ml de medio RPMI base, se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 con MNV-1, y se incubaron a 37 °C durante 90 min en agitación; posteriormente, se centrifugaron las células a 400 x g durante 5 minutos a 25 °C, se decantó el sobrenadante y se lavaron los linfocitos con PBS estéril. Posteriormente se centrifugaron las células durante 5 min a 400 x g, se decantó el sobrenadante y se agregaron 2 ml de medio RPMI suplementado al 10% de SFB, se incubaron las células durante 72 h a 37 °C y al 5% de CO₂. Después de las 72 h de incubación se centrifugaron las células a 400 x g durante 5 min, el sobrenadante se separó para realizar ensayo de plaqueo, y las células se lisaron para la realización de “western blot”.

Obtención de proteínas de lisado celular

Las células infectadas se lisaron con 60 µL de solución de lisis celular la cual contenía 100 µL de buffer de lisis 10X (tris-HCl 50 mM, NaCl 120 mM, NaF 100 mM, EDTA 1 mM), 7.8 µL de PMSF (1 mM), 2.77 µL de aprotinina (2µg/µL), 2.5 µL de Leupeptina (2µg/µL), 10 µL de NP-40 (1%) y 876.9 µL de agua “milli Q”. La lisis se realizó durante 30 minutos en hielo y se centrifugaron a 14000

rpm durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido, se separó y se cuantificó mediante el método de “Lowry”. Posteriormente, se agregó a las muestras buffer Laemmli 5X con β -mercaptoetanol y se calentaron durante 5 min a 95 °C. Por último, se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Ensayo de “Western Blot”

Se tomaron 15 μ g de proteína de las muestras obtenidas y se sometieron a electroforesis en un gel de acrilamida al 12 %, en condiciones desnaturalizantes a 80 volts. Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa durante 1 h en cámara sumergible y, se bloqueó durante 1 h con solución de leche descremada al 5%. La membrana se lavó la 3 veces (10 min por lavado) con TBS-tween (0.01%), y a continuación se colocó el anticuerpo primario anti-NS7 en dilución 1:5,000 en solución de TBS-Tween y leche descremada al 5%, durante toda la noche, en agitación y a 4 °C. Posteriormente, se lavó la membrana 3 veces con TBS-Tween y se colocó el anticuerpo secundario anti-conejo en dilución 1:10,000 en TBS-Tween y se incubó 1 h en agitación constante, por último se realizaron 3 lavados más con TBS-Tween. Se reveló la membrana con luminol Santa Cruz (SC-2048) y las imágenes se obtuvieron con ayuda del fotodocumentador “Chemidoc”.

Ensayo de Plaqueo

Para la cuantificación de virus, se utilizaron multiplacas de 24 pozos en las que se sembraron aproximadamente 2×10^6 células Raw 264.7 por pozo en medio DMEM suplementado al 10 % de SFB. Cuando las células alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 80 % se realizó el ensayo de plaqueo, para lo cual se prepararon 4 diluciones seriadas con base 10 (1:10) en medio DMEM de los sobrenadantes obtenidos de la infección de los linfocitos B, como se indica en el esquema. Posteriormente, se quitó el medio a las células y se agregaron cuidadosamente 300 μ L de los sobrenadantes con las diluciones

por duplicado. Se incubaron las placas durante 1 h a 37 °C, se retiró el sobrenadante y se agregaron cuidadosamente 500 μ L de Carboximetilcelulosa y se incubaron las placas durante 30-36 h. Después de las 36 horas de incubación se retiró cuidadosamente el medio de cada pozo y se colocaron 300 μ L de formaldehído al 3.7%, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se retiró el formaldehído y se agregaron 300 μ L de cristal violeta, se incubaron las placas durante 15 min y se revelaron sumergiendo las placas en una recipiente con agua. Se dejaron secar las multiplacas y se contó el número de placas líticas.

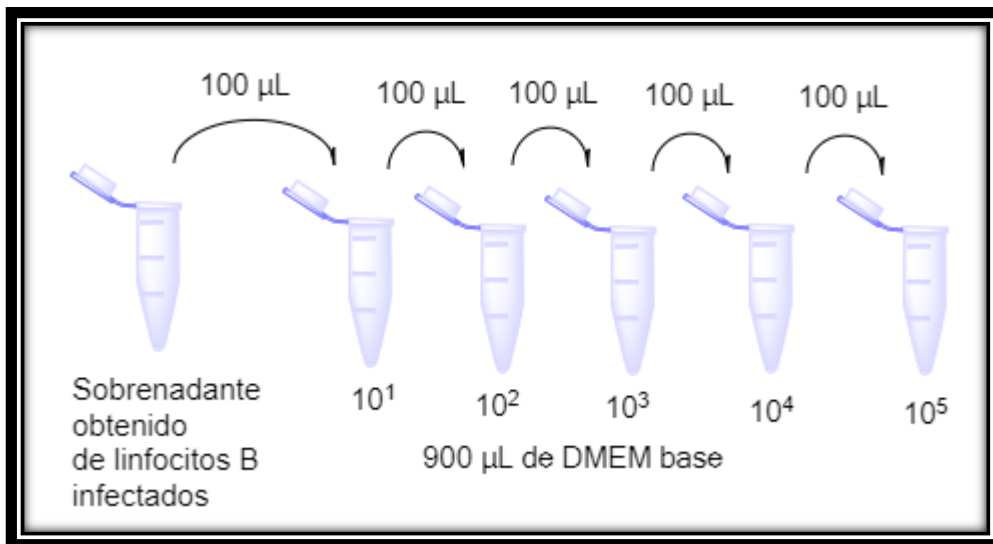


Figura 4 Diluciones seriadas de los sobrenadantes de linfocitos B infectados para la realización del ensayo de plaqueo en células Raw 264.7

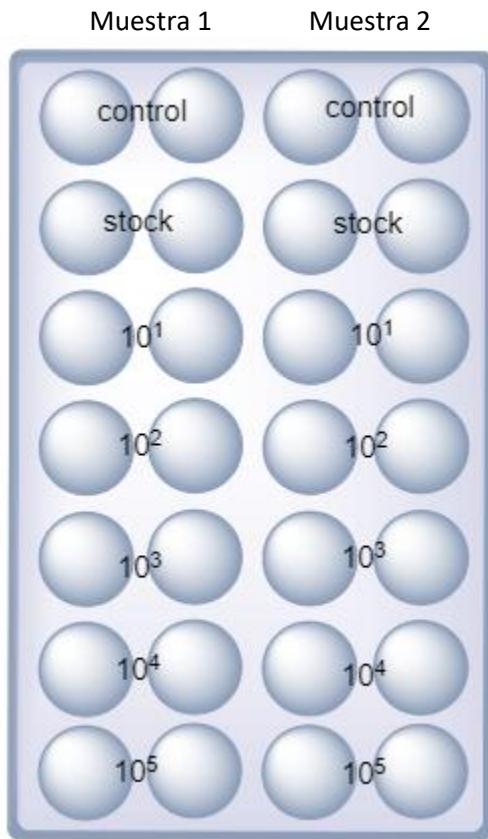


Figura 5 Diagrama de ensayo de plaqueo en células Raw 264.7. Cada pozo contenía aproximadamente 2 millones de células Raw 264.7. Se retiró el medio a cada pozo y se colocaron 300 μ L por pozo de los sobrenadantes obtenidos de los linfocitos B infectados y sus respectivas diluciones (cada una por duplicado y en el orden que se indica en la figura), se incubaron las placas durante 1 hora a 37°C, a continuación, se retiró el medio y se agregaron 500 μ L de carboximetilcelulosa, se incubaron las placas a 37°C durante 30-36 horas y se revelaron las placas

RESULTADOS

Aislamiento de linfocitos B a partir de bazo de ratón

El bazo de ratón está conformado en su mayoría, de linfocitos B y T; el porcentaje de linfocitos B en este órgano es aproximadamente del 45-55 %. Debido a que el objetivo del proyecto era infectar linfocitos B y evaluar si la activación de estos linfocitos influía en el proceso de infección celular, era necesario utilizar un método de aislamiento de linfocitos B que permitiera obtener la mayor proporción de estos linfocitos y a su vez evitar su activación celular, para así poder comparar la infección de MNV-1 en células no activadas

respecto a las activadas. Es por lo que se decidió utilizar el método de Panning de anticuerpos con anti-CD90 para obtener linfocitos B mediante selección negativa.

CD90 es una glicoproteína perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas que se expresa en distintas estirpes celulares, pero principalmente en linfocitos T, siendo un marcador de células Pan T en ratón. Debido a que esta molécula no se expresa en linfocitos B, puede ser utilizada para aislar estas células mediante selección negativa, ya que los linfocitos B no se unirán a la placa recubierta con anti-CD90.

Para evaluar que el método de obtención de linfocitos B funcionaba adecuadamente, se realizó una citometría de flujo de las células obtenidas, marcas con un anticuerpo anti-B220 acoplado a Ficoeritrina (PE), para detectar a los linfocitos B.

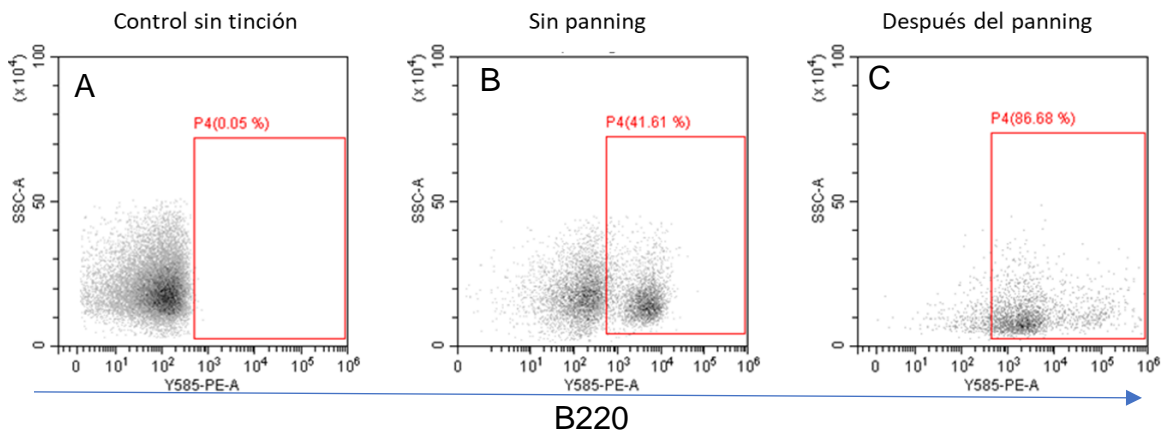


Figura 6 Citometría de flujo del enriquecimiento de linfocitos B mediante panning con anti-CD90. Se utilizaron 1 millón de células por condición. Las células se tiñeron con el anticuerpo anti-B220 acoplado a PE. En el panel A se encuentra el control de células sin tinción. En el panel B están las células mononucleares obtenidas por gradiente de "Ficoll" que no fueron sometidas a "panning" con anti-CD90. En el panel C están los linfocitos obtenidos después de 1 hora de "panning" con el anticuerpo anti-CD90.

Como se puede observar en la figura 6, en el control sin tinción la presencia de marca es mínima para B220. Posteriormente, se observó que en las células mononucleares que no fueron sometidas a "panning" con anti-CD90, el porcentaje de linfocitos B fue de 41.61%, este porcentaje concuerda con la proporción descrita para linfocitos B en el bazo de ratón (Mertens, 1976). Por

último, se observa que el porcentaje de linfocitos B obtenidos después del panning con anti-CD90 es de aproximadamente 86.68%, por lo que se consideró que este método de obtención de linfocitos B era adecuado para realizar los ensayos de infección que nos propusimos a realizar.

Activación de linfocitos B y expresión de CD44

En la literatura se ha reportado el papel de CD44 como marcador de activación de linfocitos B, y que la expresión de esta molécula aumenta de 3 a 10 veces cuando los linfocitos B se activan, siendo el estímulo con LPS + IL-4 el que permite mayor cantidad de expresión de CD44 en los linfocitos B activados. Por lo que el siguiente paso consistió en evaluar si efectivamente la activación de linfocitos B mediante el estímulo con LPS + IL-4 durante 48 h provocaba un aumento en la expresión de CD44 en los linfocitos B. Para ello, se realizó una tinción de citometría con anti-CD44 acoplado a PE, para evaluar la intensidad media de fluorescencia de esta molécula en ambas condiciones (Figura 7).

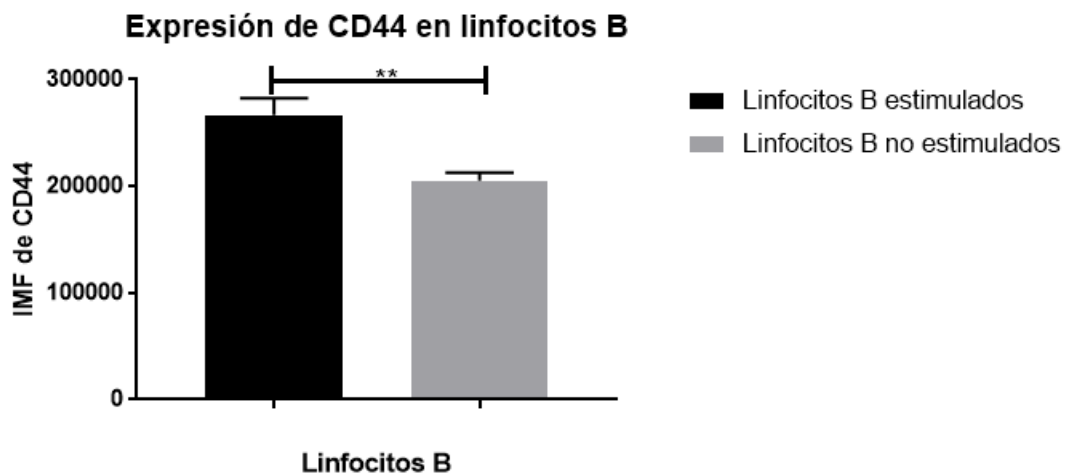


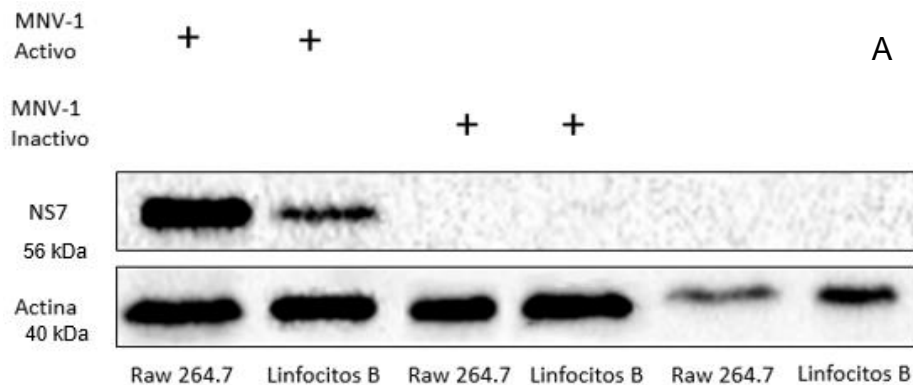
Figura 7 Expresión de CD44 en linfocitos B estimulados y no estimulados. La gráfica muestra la intensidad media de fluorescencia para CD44 de los linfocitos B no estimulados y linfocitos B después de la estimulación con LPS + IL-4 durante 48 horas. T-Student (P=0.004).

Los resultados muestran que al estimular las células con LPS + IL-4 durante 48 h aumentó la expresión de CD44 en los linfocitos B estimulados con

respecto a los no estimulados (figura 7). Esto indica que los linfocitos B si fueron activados.

Resultados de Objetivo 1: Los linfocitos B son permisivos a la infección con MNV-1

Una vez se comprobó que el aislamiento de linfocitos B era adecuado, y que las células obtenidas se estaban activando, se procedió a evaluar si los linfocitos B eran permisivos a la infección con MNV-1. Los linfocitos B obtenidos de bazo de ratón se infectaron durante 72 horas con MNV-1 a una MOI de 5 y se comparó la eficiencia de la infección con la de las células Raw 264.7, que son las células que se utilizan para la propagación de este virus, mediante un ensayo de western-blot utilizando un anticuerpo dirigido contra la proteína viral NS7 de MNV-1.



B
Densitometría de WB de los linfocitos B infectados comparados con las células Raw 264.7

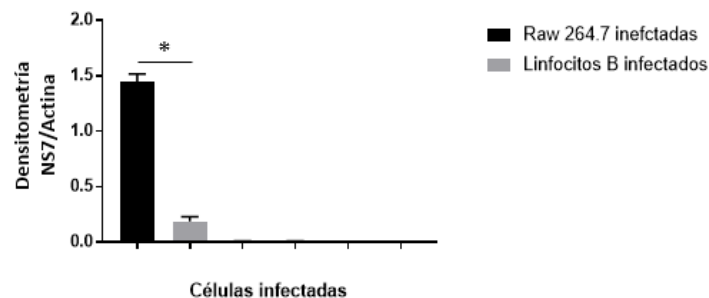


Figura 8. A) "Western blot" de la infección de MNV-1 en linfocitos B. B) Densitometría del western blot de la infección de MNV-1 en linfocitos B y células Raw 264.7. P<0.001

El ensayo de “Western blot” nos permitió detectar la expresión de la proteína viral NS7 tanto en las células Raw 267.4, como en los linfocitos B infectados, aunque en estas últimas se encontró que ésta es aproximadamente 7 veces menor (Figuras 8A y 8B). La especificidad de la detección de la banda de 56 kDa, con los anticuerpos vs NS7 del MNV, se validó mediante la ausencia de la detección en las células sin infectar, así como en las células tratadas con virus inactivado con luz ultravioleta por 1 h. Con estos ensayos se corroboró que el anticuerpo estaba reconociendo a la proteína viral de una manera específica, y no a algún componente celular. La presencia de una mayor detección de proteína viral en las células Raw 264.7 que en los linfocitos B infectados, concuerda con lo reportado por otros grupos que observaron que al infectar líneas celulares de linfocitos B como las células BJAB (Jones et al., 2015), estas eran permisivas a la infección con MNV, pero en menor proporción que los macrófagos.

Es importante recordar que se está identificando con el anticuerpo anti-NS7 es la RNA polimerasa dependiente de RNA, la cual no es parte del virus como tal, sino que se sintetiza durante la infección y se encarga de sintetizar a todo el RNA viral, tanto a los intermediarios replicativos como a las copias de RNA genómico y subgenómico viral (Hardy, 2005). Por tanto, esta proteína es clave para determinar cuándo hay una replicación viral activa. Esto sugiere que el norovirus murino no solo ingresa en el linfocito B primario, sino que es capaz de replicarse dentro de esta célula. Lo anterior permitió plantear la siguiente pregunta: Si MNV-1 es capaz de replicarse en linfocitos B, ¿Las partículas virales producidas durante la infección a los linfocitos B primarios, son capaces de infectar otras células?

Para responder a la pregunta anterior se realizó un ensayo de plaqueo viral en la línea celular de macrófagos Raw 264.7, utilizando el sobrenadante obtenido de la infección de los linfocitos B y realizando diluciones seriadas como se describió en la metodología. Los resultados mostraron la formación de placas líticas en la dilución 1×10^2 (Figura 9) lo cual confirmó que efectivamente los

linfocitos B son permisivos a la infección con MNV-1 y que las partículas virales producidas son capaces de infectar otras células como los macrófagos de la línea celular Raw 264.7.

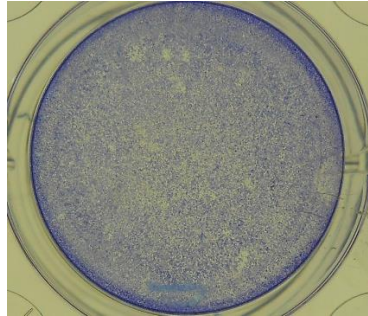


Figura 99 Ensayo de plaqueo de sobrenadante de linfocitos B infectados con MNV-1. En la figura se muestran las placas líticas obtenidas en el ensayo de plaqueo de los sobrenadantes de los linfocitos B infectados con MNV-1. Las placas líticas se observaron en la dilución 10^2 .

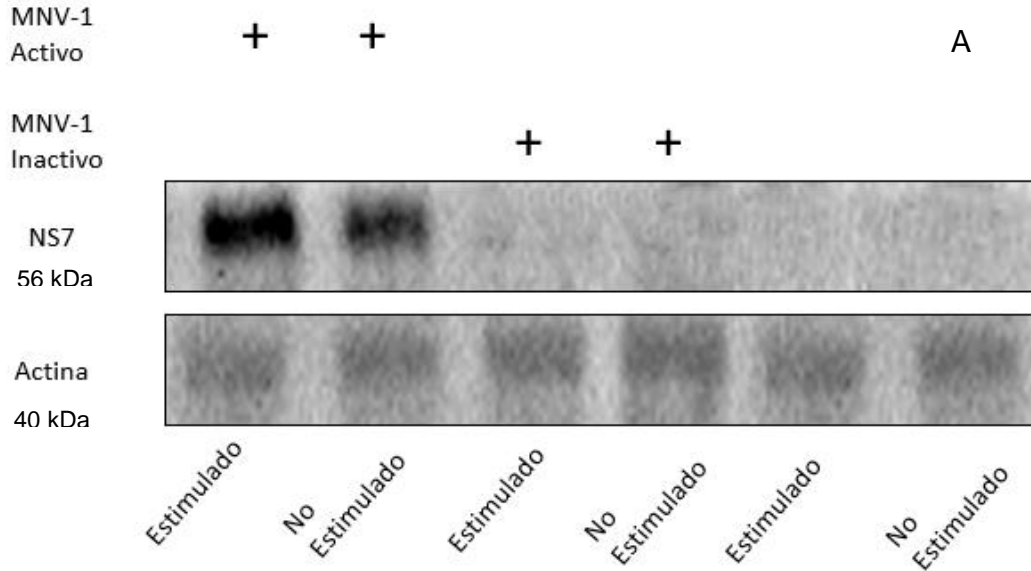
Si bien se ha reportado con anterioridad que líneas celulares de linfocitos B como las células BJAB, Wehi-231 y M12 son permisivas a la infección con Norovirus (Jones et al., 2015), nunca se había reportado la infección de MNV-1 en líneas primarias de linfocitos B.

Resultados Objetivo 2

La activación de los linfocitos B favorece la infección con MNV-1.

Cuando un linfocito B recibe señales de activación, este comienza a proliferar y a sufrir una serie de cambios morfológicos derivados de la síntesis de diversas proteínas cuya función favorece que se lleven a cabo sus funciones de manera eficiente. En la literatura se ha reportado que cuando un linfocito B se activa, aumenta la expresión de varias moléculas en su superficie, como ocurre con CD44, se sabe que CD44 puede aumentar hasta 10 veces su expresión en células activadas. Esto aunado al aumento en la proliferación celular y a una mayor actividad en la síntesis de sus proteínas, podría proporcionar mejores condiciones para el virus, debido a que habrá una mayor

cantidad de receptores para su entrada, y una mayor cantidad de células en las cuales replicarse, las cuales ofrecerán al virus una maquinaria replicativa más robusta para poder reproducirse. Lo anterior debido a que cuando un linfocito B se activa, pasa de la fase G-0 a la fase G-1 del ciclo celular, y en este proceso el linfocito B aumenta su tamaño, lo que conduce a una duplicación aproximada de los niveles de ARN y proteína, la mayoría de los cuales está dedicada a la nueva síntesis de ribosomas necesaria para la replicación celular (Gerondakis, 2007). Es por todo lo anterior que después de comprobar que los linfocitos B se infectan, y que las partículas virales producidas son capaces de infectar otras células, el siguiente objetivo fue evaluar si la activación de los linfocitos B beneficia la infección con MNV-1. Para lo cual se realizó un “Western blot” para comparar la infección de células activadas, respecto a las células no activadas. Como se muestra en la figura 11, las células B estimuladas muestran mayor cantidad de proteína NS7 respecto a las células no estimuladas (casi 3 veces más), lo cual sugiere que la síntesis de proteínas de MNV es más eficiente en los linfocitos B activados.



Densitometría de WB de los linfocitos B infectados con mnv-1, estimulados y no estimulados

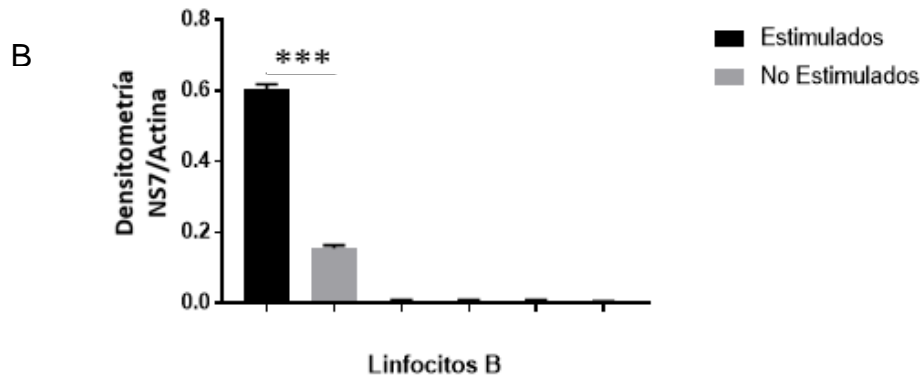


Figura 10 A) "Western blot" de la infección de MNV-1 en linfocitos B estimulados respecto a los no estimulados. B) Densitometría de la infección con MNV-1 en linfocitos B no estimulados y estimulados con LPS + IL-4. T-Student ($P < .0001$)

El encontrar que los linfocitos activados producen una mayor cantidad de proteína viral podría sugerir que el MNV se replica más eficientemente en los linfocitos B estimulados respecto a los no estimulados con LPS + IL-4. Para comprobar esta hipótesis, se comparó si la producción de partículas virales de células estimuladas era mayor que las de las no estimuladas mediante ensayos de plaqueo con los sobrenadantes obtenidos en ambas condiciones.

Al comparar la producción de partículas virales de ambos ensayos, se encontró que el título viral obtenido fue significativamente, casi 3 veces más ($p < 0.0280$ t-student) en los linfocitos B estimulados respecto a los no estimulados (Figuras 10A y 10B), lo cual corrobora la hipótesis de que en los linfocitos B estimulados la infección por MNV-1 se produce con mayor eficiencia que en los linfocitos B no estimulados.

Título viral de linfocitos B estimulados y no estimulados infectados con MNV-1

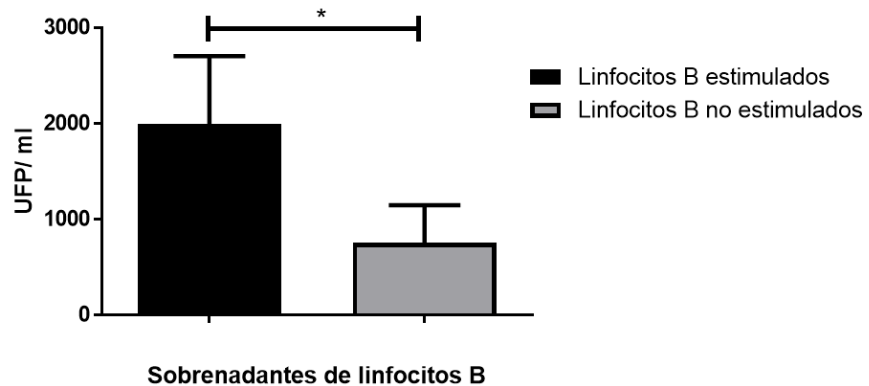


Figura 11 Ensayo de plaqueo de sobrenadantes de linfocitos B estimulados y no estimulados infectados con MNV-1. T-Student ($p < 0.0280$)

Resultados objetivo 3: El bloqueo del receptor CD44 con el anticuerpo IM-7, disminuye significativamente la entrada de MNV-1 a los linfocitos B.

Dado que las células B no presentan a la molécula CD300lf, la cual ha sido reportada como uno de los principales receptores para el MNV, una posibilidad es que CD44 pudiera ser uno de los receptor de entrada para MNV-1 en estas células. Para determinar si CD44 participa en la entrada del MNV en células B, se bloqueó a CD44 con el anticuerpo IM-7, el cual está dirigido contra el sitio de unión de CD44 con su ligando, el ácido hialurónico. Posteriormente se realizó la infección con MNV-1 durante 1.5 h en agitación a 37 °C y se incubaron las células durante 72 h a 37 °C. Una vez concluido este tiempo se

analizó la entrada y replicación viral mediante la presencia de NS7 en lisados celulares totales.

Así mismo se evaluó el título viral de los sobrenadantes obtenidos en este ensayo, y se encontró que en las células que fueron tratadas con el anticuerpo IM-7 la cantidad de partículas virales producidas se redujo de manera significativa ($P=0.002$), esto debido probablemente a que a una menor entrada de partículas virales a los linfocitos B como resultado del bloqueo de CD44.

Ensayo de plaqueo de linfocitos B infectados bloqueando CD44

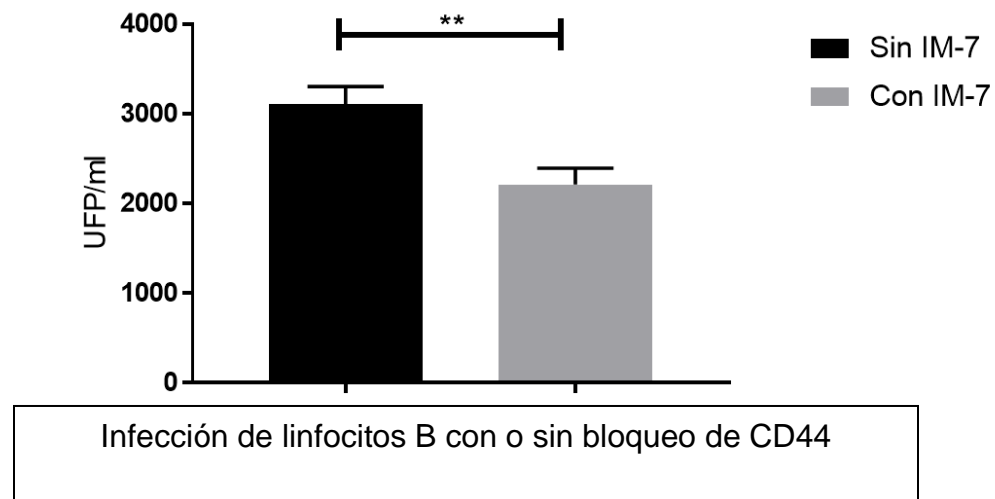


Figura 12 Ensayo de plaqueo de sobrenadantes de linfocitos B infectados con MNV-1 bloqueando o no el receptor CD44. T-Student ($p<0.0042$)

Estos resultados sugieren que la molécula CD44 podría participar en la entrada del MNV en célula B de bazo.

DISCUSIÓN

MNV-1 representa el mejor modelo para el estudio de la biología molecular y la patogenia de los norovirus, así como su interacción con las células del huésped (Wobus, 2006). Se sabe hasta ahora que los norovirus infectan distintos tipos celulares, presentando un especial tropismo por células del sistema inmunológico como los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos B (Bartnicki, 2017). Estos últimos, han sido particularmente

estudiados debido a que se ha observado que algunas líneas celulares de linfocitos B son capaces de infectarse con Norovirus humanos (Jones, et al, 2014; Jones, et al, 2015). Los linfocitos B son un componente esencial del sistema inmunológico adaptativo y, por tanto, son de suma importancia para contener y eliminar el virus. Se ha observado que pacientes con respuestas inmunes adaptativas comprometidas pueden infectarse con norovirus de manera crónica (Brown, 2016).

Se han descrito distintos receptores de norovirus en las células B, siendo los principales los pertenecientes a la familia de CD300: CD300Id y Cd300If (Orchard, 2016), pero en los linfocitos B no se ha descrito la presencia de CD300Id, aunque en las bases de datos podemos encontrar que CD300If puede expresarse a nivel de RNAm en linfocitos B. En ambos casos no se sabe con certeza si realmente estos receptores se expresan en los linfocitos B. Dada la importancia de los receptores celulares en el proceso de entrada de los virus a la célula huésped, es importante evaluar la posible participación de otros receptores en la entrada de MNV al linfocito B.

En la literatura se han reportado distintas líneas celulares de linfocitos B que son susceptibles a la infección con MNV y norovirus humano (Jones, et al, 2015). Uno de los inconvenientes de los cultivos celulares es que, al ser células transformadas, algunos de sus procesos distan de lo que ocurre de manera fisiológica en un organismo como el ratón. Hasta ahora no existen reportes de infecciones de MNV-1 en cultivos de linfocitos B primarios, y este tipo de cultivos celulares nos mostraría una situación más cercana a lo que ocurre en las células del huésped.

Debido a que no existen reportes de la infección de MNV-1 en linfocitos B primarios, el primer objetivo del presente trabajo fue evaluar si estas células eran permisivas a la infección con MNV-1. Los resultados obtenidos indican que los linfocitos B primarios provenientes del bazo de ratones C57BL6/J son susceptibles a la infección con MNV-1. Esto se validó mediante la detección de la proteína NS7 por ensayo de "Western blot". Debido a que la RNA

polimerasa dependiente de RNA solo se sintetiza dentro de la célula del huésped, su detección indica que MNV-1 está ingresando a la célula B y se está replicando.

Al evaluar si los linfocitos B producían partículas virales con la capacidad de infectar otras células, mediante ensayo de plaqueo en células Raw 264.7 se encontró la presencia de partículas virales en un orden de 10^2 , lo cual indica que las partículas virales producidas por los sobrenadantes de linfocitos B infectados son viables y capaces de infectar otras células.

Una vez corroborado que el MNV puede replicarse en linfocitos B de bazo de ratón, el siguiente objetivo fue evaluar si la activación de los linfocitos B promovía una mejor infección de MNV-1 a la célula, debido a que en un linfocito B activado la molécula de superficie CD44 se expresa de 3 a 10 veces más. Los resultados indican que un linfocito B activado produce casi el doble de partículas virales con respecto a un linfocito B no activado, lo cual confirma la hipótesis de que la activación de los linfocitos B promueve una mejor infección con norovirus a la célula B. Este resultado también es novedoso debido a que en la literatura no se ha evaluado el efecto de la activación celular en la infección de MNV-1 a la célula, probablemente esto se deba a que principalmente se han utilizado líneas celulares, las cuales encuentran en un estado activado permanente.

Por último, se evaluó si el receptor CD44 estaba involucrado en la entrada del MNV a la células B. Para ello, se utilizó como estrategia el bloqueo de CD44 con anticuerpos y determinar si disminuía la entrada del virus a la célula y por ende la cantidad de virus que se producía en el linfocito B. Los resultados mostraron que al bloquear el receptor CD44 se produjo una menor cantidad de partículas virales (26% menos), comparado con las células a las que no se les bloqueó el receptor CD44. Los resultados concuerdan con los reportados por Cunha y cols., en donde se reporta el papel de CD44 en la entrada de MNV-1. En este trabajo, se reporta que la disminución es de hasta el 50% de unión de MNV-1 a las células dendríticas provenientes de médula ósea (Cunha

& Webus 2016) inhibición mayor a la encontrada en este trabajo. Esta diferencia puede deberse a 3 aspectos; el primero es que el tipo celular utilizado es distinto, debido a que estos autores utilizaron células dendríticas provenientes de médula ósea y nosotros utilizamos linfocitos B de bazo. El segundo aspecto es que el grupo de Cunha realizó sus experimentos utilizando un ratón deficiente de CD44, lo cual es una estrategia en donde se tiene la certeza de que no hay expresión de CD44, mientras que la inhibición por anticuerpos podría ser un bloqueo parcial. Realizar ensayos con diferentes concentraciones de anticuerpo permitirá determinar si el bloqueo de CD44 logrado es del 100 % y si esto influye en la unión de MNV a las células B de manera dependiente de dosis. El tercer aspecto es que evaluamos la cantidad de partículas virales producidas después del bloqueo y ellos evaluaron directamente la unión del virus a la célula (Cunha, 2016). Por tanto, se plantea en un futuro evaluar este aspecto mediante ensayos de unión del virus a la célula utilizando células provenientes de bazo de ratones deficientes de CD44.

CONCLUSIONES

Con base a todo lo anterior podemos concluir lo siguiente:

- Los linfocitos B son susceptibles a la infección con MNV-1.
- La activación de los linfocitos B mediante el estímulo de LPS + IL-4 promueve una infección más eficiente de MNV-1 en el linfocito B.
- El bloqueo de CD44 con el anticuerpo IM-7 disminuye de manera significativa la cantidad de virus que se produce en los linfocitos B.

PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de la deficiencia de CD44 en la unión del virus a la célula mediante la utilización del ratón K.O de CD44
- Analizar el efecto de la deficiencia o silenciamiento de los diferentes receptores MNV-1 en la célula B (CD36, CD98 y TfR).

- Realizar ensayos de citometría para evaluar el porcentaje de linfocitos B que se infectan con MNV-1.
- Comparar la susceptibilidad a la infección con MNV-1 de los linfocitos B provenientes de placas de Peyer, lamina propia y peritoneo.

BIBLIOGRAFÍA

- Adler, J. L., & Zickl, R. (1969). Winter Vomiting Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 119(6), 668-673. doi: 10.1093/infdis/119.6.668
- Bartnicki, E., Cunha, J. B., Kolawole, A. O., & Wobus, C. E. (2017). Recent advances in understanding noroviruses. *F1000Research*, 6, 79. doi: 10.12688/f1000research.10081.1
- Blacklow, N. R., Dolin, R., Fedson, D. S., Dupont, H., Northrup, R. S., Hornick, R. B., & Chanock, R. M. (1972). Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: etiology and pathogenesis. *Annals of Internal Medicine*, 76(6), 993-1008.
- Brown, J. R., Gilmour, K., & Breuer, J. (2016). Norovirus Infections Occur in B-Cell-Deficient Patients. *Clinical Infectious Diseases*, 62(9), 1136-1138.
- Cortina, L. S., & Gutiérrez, B. C. (2009). Manejo actual de la gastroenteritis aguda (GEA) con soluciones de rehidratación oral. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*, 29(2), 6-14.
- Cunha, J. B., & Wobus, C. E. (2016). Select membrane proteins modulate MNV-1 infection of macrophages and dendritic cells in a cell type-specific manner. *Virus research*, 222, 64-70. doi: 10.1016/j.virusres.2016.06.001
- Doom, C. M., Turula, H. M., & Hill, A. B. (2009). Investigation of the impact of the common animal facility contaminant murine norovirus on experimental murine cytomegalovirus infection. *Virology*, 392(2), 153-161. doi: 10.1016/j.virol.2009.05.035
- Franck, K. T., Fonager, J., Ersbøll, A. K., & Böttiger, B. (2014). Norovirus Epidemiology in Community and Health Care Settings and Association with Patient Age,

- Denmark. *Emerging Infectious Diseases*, 20(7), 1123-1131. doi: 10.3201/eid2007.130781
- Glass, R. I., Parashar, U. D., & Estes, M. K. (2009). Norovirus Gastroenteritis. *The New England Journal of Medicine*, 361(18), 10.1056/NEJMra0804575. doi: 10.1056/NEJMra0804575
- Gerondakis, S., Grumont, R. J. and Banerjee, A. (2007), Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals. *Immunol Cell Biol*, 85: 471-475. doi:10.1038/sj.icb.7100097
- Haga, K., Fujimoto, A., Takai-Todaka, R., Miki, M., Doan, Y. H., Murakami, K., . . . Katayama, K. (2016). Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld within the CD300 family enable murine noroviruses to infect cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(41), E6248-E6255. doi: 10.1073/pnas.1605575113
- Hardy, Michele E. (2005). Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), 1-8. doi: doi:10.1016/j.femsle.2005.08.031
- Hyde, J. L., & Mackenzie, J. M. (2010). Subcellular localization of the MNV-1 ORF1 proteins and their potential roles in the formation of the MNV-1 replication complex. *Virology*, 406(1), 138-148.
- Hardy, M. E., Crone, T. J., Brower, J. E., & Ettayebi, K. (2002). Substrate specificity of the Norwalk virus 3C-like proteinase. *Virus Research*, 89(1), 29-39.
- Hsu, C. C., Piotrowski, S. L., Meeker, S. M., Smith, K. D., Maggio-Price, L., & Treuting, P. M. (2016). Histologic Lesions Induced by Murine Norovirus Infection in Laboratory Mice. *Veterinary Pathology*, 53(4), 754-763. doi: 10.1177/0300985815618439
- Hsu, C. C., Riley, L. K., Wills, H. M., & Livingston, R. S. (2006). Persistent infection with and serologic crossreactivity of three novel murine noroviruses. *Comparative Medicine*, 56(4), 247-251.
- Jones, M. K., Watanabe, M., Zhu, S., Graves, C. L., Keyes, L. R., Grau, K. R., ... Karst, S. M. (2014). Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6210), 755-759. <http://doi.org/10.1126/science.1257147>

- Jones, M. K., Grau, K. R., Costantini, V., Kolawole, A. O., de Graaf, M., Freiden, P., . . . Karst, S. M. (2015). Human norovirus culture in B cells. *Nature protocols*, 10(12), 1939-1947. doi: 10.1038/nprot.2015.121
- Karst, S. M. (2010). Pathogenesis of Noroviruses, Emerging RNA Viruses. *Viruses*, 2(3), 748-781. doi: 10.3390/v2030748
- Karst, S. M., & Tibbetts, S. A. (2016). Recent Advances in Understanding Norovirus Pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 88(11), 1837-1843. doi: 10.1002/jmv.24559
- Lay, M. K., Atmar, R. L., Guix, S., Bharadwaj, U., He, H., Neill, F. H., . . . Estes, M. K. (2010). Norwalk Virus Does Not Replicate in Human Macrophages or Dendritic Cells Derived from the Peripheral Blood of Susceptible Humans. *Virology*, 406(1), 1-11. doi: 10.1016/j.virol.2010.07.001
- McFadden, N., Bailey, D., Carrara, G., Benson, A., Chaudhry, Y., Shortland, A., . . . Goodfellow, I. (2011). Norovirus Regulation of the Innate Immune Response and Apoptosis Occurs via the Product of the Alternative Open Reading Frame 4. *PLoS Pathogens*, 7(12), e1002413. doi: 10.1371/journal.ppat.1002413
- Mertens, H., & Krueger, G. R. F. (1976). Percent distribution of T-and B-lymphoid cells in spleen and lymph nodes of Moloney virus infected mice Die prozentuale Verteilung von T-und B-lymphoiden Zellen in Milz und Lymphknoten von Moloney-Virus-infizierten Mäusen. *Zeitschrift für Krebsforschung und Klinische Onkologie*, 85(2), 169-175.
- Moncayo Posligua, K. J. (2017). *LA GASTROENTERITIS Y SU INCIDENCIA EN NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS EN EL ÁREA DE PEDIATRÍA DEL HOSPITAL MIGUEL H. ALCÍVAR DE LA PARROQUIA DE LEONIDAS PLAZA. Tesis Doctoral.*
- Newman, K. L., & Leon, J. S. (2015). Norovirus immunology: Of mice and mechanisms. *European Journal of Immunology*, 45(10), 2742-2757. doi: 10.1002/eji.201545512
- Ng, K. K.-S., Pendás-Franco, N., Rojo, J., Boga, J. A., Machín, À., Alonso, J. M. M., & Parra, F. (2004). Crystal structure of norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16638-16645.
- Norovirus Cultured for the First Time. (2004). *PLoS Biology*, 2(12), e445. doi: 10.1371/journal.pbio.0020445

- Orchard, R. C., Wilen, C. B., Doench, J. G., Baldrige, M. T., McCune, B. T., Lee, Y. C. J., ... & Virgin, H. W. (2016). Discovery of a proteinaceous cellular receptor for a norovirus. *Science*, 353(6302), 933-936.
- Schreiber, D. S., Blacklow, N. R., & Trier, J. S. (1974). The small intestinal lesion induced by Hawaii agent acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Infectious Diseases*, 129(6), 705-708.
- Souza, M., Azevedo, M. S. P., Jung, K., Cheetham, S., & Saif, L. J. (2008). Pathogenesis and Immune Responses in Gnotobiotic Calves after Infection with the Genogroup II.4-HS66 Strain of Human Norovirus. *Journal of Virology*, 82(4), 1777-1786. doi: 10.1128/JVI.01347-07
- Tan, M., & Jiang, X. (2011). Norovirus-host interaction: multi-selections by human HBGAs. *Trends in Microbiology*, 19(8), 382-388. doi: 10.1016/j.tim.2011.05.007
- Taube, S., Kolawole, A. O., Höhne, M., Wilkinson, J. E., Handley, S. A., Perry, J. W., . . . Wobus, C. E. (2013). A Mouse Model for Human Norovirus. *mBio*, 4(4), e00450-00413. doi: 10.1128/mBio.00450-13
- Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Shirley, S. H., Lee, D., & Vinjé, J. (2014). Genotypic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(1), 147-155. doi: 10.1128/JCM.02680-13
- Vinjé, J. (2015). Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), 373-381. doi: 10.1128/JCM.01535-14
- Wobus, C. E., Thackray, L. B., & Virgin, H. W. (2006). Murine Norovirus: a Model System To Study Norovirus Biology and Pathogenesis. *Journal of Virology*, 80(11), 5104-5112. doi: 10.1128/JVI.02346-05