



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**“Participación de CD44 en el proceso de unión del norovirus  
murino-1 (MNV-1) en linfocitos B de ratón.”**

# **T E S I S**

**Que presenta**

**M. en C. CARLOS EMILIO MIGUEL RODRÍGUEZ**

**Para obtener el grado de**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**Directores de la tesis**

**Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano**

**Dr. Leopoldo Santos Argumedo**

**Ciudad de México**

**Julio, 2024**

## **AGRADECIMIENTOS:**

A Conahcyt por la beca 727506 otorgada durante los 4 años de estancia en el posgrado, así como, al proyecto 255053.

A Dios, por darme la fuerza de voluntad necesaria para continuar a pesar de las dificultades.

A mis padres, por cada uno de sus esfuerzos y sacrificios, por apoyar cada una de mis aspiraciones, espero poder retribuirles de la mejor manera.

A mi hermano y cuñada, gracias por el apoyo emocional y personal en los momentos necesarios.

A cada uno los profesores a lo largo de mi vida, cada uno contribuyó en mayor o menor medida en cada una de mis decisiones, las cuales me trajeron hasta aquí.

Al Dr. Leopoldo Santos Argumedo y la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, mis directores de tesis, por su paciencia, consejos y apoyo emocional en momentos clave.

A mis sinodales, Dra. Patricia Talamás, Dra., Rosa María del Ángel, Dr. Fernando Esquivel y Dr. Juan Ernesto Ludert; por su disponibilidad y sugerencias en el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Inmunología, Vania, David, Mizael, Diana, Erick, Iván y Felipe, gracias por sus consejos, sus comentarios, y sobre todo su amistad incondicional, gracias a cada uno de ustedes mi estancia en el laboratorio fue una de las mejores etapas de mi vida.

A mis compañeros del laboratorio de virología, Carolina, Yoatzin, Jaury, Sharon, Adriana y Randy, por cada uno de sus consejos y sugerencias, los cuales me ayudaron a mejorar académicamente.

A mis compañeros de generación, Irving, Elena, Arely y Noé. Por sus consejos y apoyo emocional.

A los Auxiliares, Dr. Héctor Romero Ramírez y Clotilde Cancio Lonches, por proveerme el material necesario y por el tiempo dedicado en instruirme en varias de las técnicas del laboratorio.

Al los técnicos Lenin Estudillo y Jesús Guzmán, por proveerme del material necesario para realizar mis experimentos y sobre todo su valiosa amistad.

Al MVZ. Ricardo Gaxiola Centeno, Tec. Victor Manuel García Gómez, Tec. Felipe Cruz Martínez, MVZ. Benjamín Emmanuel Chávez Álvarez y MVZ. Octavio Ramos, por su apoyo en lo que respecta al manejo de los animales del laboratorio.

Al Mtro. Victor Rosales, por su amistad, apoyo personal y consejos en lo que respecta a citometría de flujo.

## **RESUMEN:**

El norovirus murino (MNV) es uno de los mejores modelos para entender la biología y patogenia de los calicivirus, importantes generadores de gastroenteritis en humanos y de diversas enfermedades de importancia veterinaria. El MNV presenta tropismo por las células del sistema inmunológico, incluyendo macrófagos, células dendríticas y linfocitos B; estas últimas, de especial interés debido a que también son blanco de la infección por norovirus humanos. En trabajos anteriores demostramos que los linfocitos B murinos son permisivos a la infección por MNV-1; sin embargo, es poco lo que se conoce sobre los procesos de unión y entrada del virus a estas células. Se ha descrito que los receptores principales para la entrada del MNV a macrófagos son CD300ld y CD300lf; el análisis bioinformático muestra que el mensajero de CD300lf se expresa únicamente en una subpoblación de linfocitos B (linfocitos de la zona marginal). Es por ello por lo que decidimos investigar si otras moléculas participan en la unión y/o entrada del MNV a los linfocitos B. Una de estas moléculas es CD44, que ya se ha mostrado que participa en la unión de MNV-1 a células dendríticas derivadas de médula ósea. Por lo anterior, en este proyecto nos enfocamos en investigar la participación de CD44 y CD300lf en el proceso de unión de MNV-1 a los linfocitos B. Inicialmente corroboramos que CD300lf se expresa únicamente en linfocitos B de zona marginal, a diferencia de CD44 que se expresa en todos los linfocitos B provenientes de bazo de ratón. CD44 incrementa su expresión durante la activación de los linfocitos B, lo que coincide con una mayor susceptibilidad a la infección viral, lo que no ocurre con CD300lf. Finalmente, utilizando linfocitos B de un modelo murino deficiente de CD44, y adicionalmente, mediante el bloqueo con 2 clones de anticuerpos contra CD44 en linfocitos B de ratones silvestres, encontramos que CD44 participa en la unión MNV-1 a linfocitos B murinos.

**ABSTRACT:**

Murine norovirus (MNV) is one of the best models to understand the biology and pathogenesis of caliciviruses, important generators of gastroenteritis in humans and various diseases of veterinary importance. MNV presents tropism for immune system cells, including macrophages, dendritic cells, and B lymphocytes; the latter is particularly interesting because they are also targets of human norovirus infection. In previous work, we demonstrated that murine B lymphocytes are permissive to MNV-1 infection; However, little is known about the processes of virus binding and entry into these cells. It has been described that the main receptors for the entry of MNV into macrophages are CD300ld and CD300lf. Bioinformatic analysis shows that the CD300lf messenger is expressed only in a subpopulation of B lymphocytes (marginal zone lymphocytes). In this work, we decided to investigate whether other molecules participate in the binding and entry of MNV to B lymphocytes. One of these molecules is CD44, which has already been shown to participate in the binding of MNV-1 to bone marrow dendritic cells. Therefore, in this project, we focus on investigating the participation of CD44 and CD300lf in the process of binding MNV-1 to B lymphocytes. Initially, we corroborate that CD300lf is expressed only in marginal zone B lymphocytes, unlike CD44, expressed in all B lymphocytes from the mouse spleen. CD44 increases its expression during B lymphocyte activation, which coincides with a greater susceptibility to viral infection, which does not occur with CD300lf. Finally, using B lymphocytes from a CD44-deficient murine model and blocking with two clones of antibodies against CD44 in B lymphocytes from wild-type mice, we found that CD44 participates in MNV-1 binding to murine B lymphocytes.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS:.....	2
RESUMEN:.....	4
ABSTRACT:.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS:.....	8
ÍNDICE DE TABLAS:.....	9
INTRODUCCIÓN:.....	10
Generalidades de norovirus. ....	10
Biología de los norovirus. ....	12
MARCO TEÓRICO:.....	16
Modelos de infección.....	16
Tropismo de norovirus.....	18
Infección en linfocitos B.....	22
Receptores para norovirus. ....	24
CD44.....	26
Miosinas.....	27
Myo1g.....	28
JUSTIFICACIÓN:.....	29
HIPÓTESIS:.....	29
OBJETIVO GENERAL:.....	30
OBJETIVOS PARTICULARES:.....	30
METODOLOGÍA.....	30
Mapa de calor de expresión de moléculas de unión para MNV-1 en leucocitos. ....	30
Aislamiento de células Mononucleares.....	30
Enriquecimiento de linfocitos B.....	31

Titulación de anticuerpos para bloqueo de CD44 y CD300lf. ....	31
Ensayo de bloqueo de moléculas de unión para MNV-1.....	32
Ensayo de Infección con MNV-1. ....	33
Ensayo de unión con MNV-1.....	33
Extracción de RNA. ....	33
Detección de copias de MNV-1 mediante qPCR.....	33
Ensayo de microscopía confocal.....	36
Obtención de proteínas de lisado celular. ....	36
Ensayo de Western Blot.....	37
Ensayo de Plaqueo .....	37
Desarrollo de anticuerpo anti-NS7 .....	38
Diseño de primers: .....	38
Clonación, expresión y purificación de la proteína NS7. ....	41
Generación de suero policlonal de IgG de rata anti-NS7: .....	47
RESULTADOS:.....	49
Los linfocitos B expresan moléculas de unión para el MNV-1.....	49
La activación de los linfocitos B de ratón favorece la expresión de CD44, pero no de CD300lf en la membrana celular. ....	52
CD44 participa en la unión del MNV-1 a los linfocitos B de bazo de ratón. ....	54
La ausencia de Myo1g afecta la localización de moléculas de unión para MNV-1 en la membrana de linfocitos B. ....	58
Myo1g participa en el proceso de entrada de MNV-1 a los linfocitos B.....	60
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES: .....	66
PROSPECTIVAS: .....	67

BIBLIOGRAFÍA.....	68
ANEXOS.....	87

### ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Estructura del norovirus.....	13
Figura 2 Estructura de Myo1g.....	28
Figura 3. Condiciones de ciclado para qPCR. ....	35
Figura 4. Esquema para ensayo de plaqueo en células Raw 264.7. ....	38
Figura 5. Análisis bioinformático para el diseño de plásmido pRSET A-NS7. .....	40
Figura 6. Clonación de proteína NS7 de MNV. ....	43
Figura 7. Expresión de la proteína NS7-6His en bacterias DH5 $\alpha$ . ....	45
Figura 8. Purificación de la proteína NS7. ....	46
Figura 9. Realización de anticuerpo anti-NS7.....	48
Figura 10. CD300lf y CD44 se expresan en los linfocitos B.....	49
Figura 11. Expresión de CD300lf en la subpoblación de linfocitos B del bazo. .....	52
Figura 12. Expresión de CD300lf y CD44 en linfocitos B estimulados.....	53
Figura 13. Titulación de anticuerpos específicos para CD44.....	54
Figura 14. CD44 es un factor de unión para MNV-1 en los linfocitos B. ....	56
Figura 15. Los linfocitos B deficientes de CD44 presentan menor unión de MNV-1.....	57
Figura 16. La deficiencia de Myo1g afecta la unión de MNV-1 en los linfocitos B. ....	59

## ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Resumen de los tipos celulares que soportan la replicación in vitro de norovirus humano (HuNoV) y norovirus murino (MNV).....	20
Tabla 2. Resumen de los tipos celulares por los cuales los HuNoV y los MNV tienen tropismo en pacientes inmunocompetentes o inmunocomprometidos. ....	21
Tabla 3. Diluciones utilizadas para la titulación de los anticuerpos IM7 y NIM-R8 mediante citometría de flujo. ....	32
Tabla 4. Concentraciones de reacción para obtención de cDNA.....	34
Tabla 5. Condiciones de ciclado para obtención de cDNA .....	34
Tabla 6. Concentraciones para reacción de qPCR .....	35
Tabla 7 Condiciones de PCR para clonación de secuencia de NS7.....	41
Tabla 8. Condiciones de digestión enzimática. ....	41
Tabla 9. Condiciones para ligación pJET1.2-NS7.....	42

## **INTRODUCCIÓN:**

### **Generalidades de norovirus.**

Los norovirus clasificados en el género *Norovirus*, en la familia *Caliciviridae*, son virus de RNA, no envueltos que tienen un tamaño de 27-38 nm de diámetro (Prasad et al., 1994a). Esta familia debe su nombre a que, cuando las partículas virales son observadas mediante microscopía electrónica, sus cápsides parecen formar una copa o cáliz (Dolin & Treanor, 2015; Green, 2006). Esta familia de virus está conformada por 11 géneros que afectan a diversos vertebrados, causándoles distintas infecciones que van desde las gastrointestinales, vesiculares, hemorrágicas y sistémicas.

El género *Norovirus*, está compuesto por virus que afectan animales, como el norovirus murino (MNV) uno de los principales modelos de estudio de la patogenia y biología de los calicivirus y los norovirus humanos (HuNoV), responsables de los principales brotes de gastroenteritis no bacteriana a nivel mundial que afectan a personas de todas las edades (Patel et al., 2008). Este género, está constituido por 10 genogrupos (GI a GX) (Chhabra et al., 2019); a su vez, cada genogrupo contiene distintos genotipos cuya clasificación está basada en las diferencias que existen en la secuencia de la proteína viral 1 (VP1), la cual es altamente variable. Las secuencias de VP1 pueden variar hasta un 60% entre genogrupos y hasta un 30% entre genotipos (Lauring et al., 2013; Schneider & Roossinck, 2001).

De los distintos Genogrupos de norovirus, el Genogrupo II es el responsable de las infecciones en humanos; en específico, el GII.4 y más recientemente el GII.17 son responsables de la mayoría de los brotes de gastroenteritis (Siebenga et al., 2009) (de Graaf et al., 2015; Lu et al., 2016).

### **Epidemiología de los norovirus de humano:**

En 2019, la organización mundial de la salud reportó alrededor de 15 millones de infecciones gastrointestinales causadas por norovirus en el 2019 (WHO,

2019). A nivel mundial, se estima que HuNoV causa aproximadamente 200,000 muertes cada año en niños menores de cinco años (Patel et al., 2008). Si bien, en algunos casos la infección por norovirus puede ser letal, en la mayoría de los casos, esta infección suele ocurrir de manera rápida y sin necesidad de asistencia médica. Los síntomas aparecen entre las 12 a 48 h posteriores a la exposición al patógeno, y las personas infectadas comienzan a sentirse mejor de 1 a 3 días posteriores a la aparición de los síntomas (Teunis et al., 2008).

Los brotes de infección por norovirus ocurren principalmente en entornos semicerrados con gran afluencia de personas, en lugares como: escuelas, hogares de ancianos o cruceros (MARSH et al., 2018). Se ha reportado que de 2008 a 2014 los HuNoV causaron el 97% de los brotes de gastroenteritis aguda reportados en cruceros en Estados Unidos de Norteamérica. La transmisión ocurre por diferentes vías: a través del consumo de alimentos y agua contaminada (Mouchtouri et al., 2017), (Cheng et al., 2017; Maunula et al., 2005). Otros tipos de transmisión pueden ser a través del contacto con superficies contaminadas (Canales et al., 2019), y por el contacto entre personas (Kwan et al., 2017).

De acuerdo con el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés), los HuNoV son la principal causa de enfermedades transmitidas por alimentos en Estados Unidos de Norteamérica. La mayoría de los brotes ocurren entre los meses de noviembre y abril (Centers for Disease Control and Prevention, 2023) y en ese país producen anualmente 900 muertes en adultos mayores de 65 años y 465 mil visitas al departamento de emergencias por gastroenteritis aguda en niños. Si bien estos 2 grupos de edad son los más afectados por este virus, todos los grupos de edades son susceptibles a ser infectados, generando costos de 2 mil millones de dólares anuales por pérdida de productividad laboral (Centers for Disease Control and Prevention, 2023).

En México existen pocos estudios respecto a la prevalencia de los HuNoV y dado que la infección se resuelve en pocos días, sin necesidad de atención médica especializada, se suele subestimar su prevalencia en la población en general. Sin embargo, a partir de la introducción de la vacuna de rotavirus, se considera que los norovirus son el principal agente viral causante de gastroenteritis.

Debido a la dificultad para propagar eficientemente a los HuNoV, se han utilizado modelos como el calicivirus felino (FCV) y el MNV para entender la biología de estos virus (Bidawid et al., 2003; Wobus et al., 2006).

### **Biología de los norovirus.**

#### 1. Organización genómica de los norovirus.

Los norovirus están conformados por un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 7.5 kb el cual, en su extremo 5' se encuentra unido a una proteína no estructural llamada proteína ligada al genoma o "VPg" y en el extremo 3' contiene una cola de poly-A (**Figura 1A**) (Alhatlani et al., 2015). Su genoma se divide en 3 marcos de lectura abiertos (ORF 1-3). En el primero se codifica una poliproteína, la cual, es procesada por la proteasa del virus, dando origen a 6 proteínas no estructurales maduras (NS1/2 a NS7) (Hardy, 2005; Jiang et al., 1993). El ORF2 da lugar a la llamada proteína mayoritaria de la cápside o "VP1"; 180 copias (90 dímeros) de VP1 conforman la cápside icosaédrica del virus (**Figura 1**) (Robilotti et al., 2015). El ORF3 codifica para la proteína "VP2" o minoritaria de cápside, debido a que se encuentra en pocas copias en la cápside del virus (Hardy, 2005; Prasad et al., 1994b). En el MNV, se ha descrito un cuarto marco de lectura (ORF4) el cual codifica para una proteína llamada factor de virulencia 1 (VF1) (Thackray et al., 2007) que participa antagonizando la respuesta inmune innata del huésped, principalmente antagonizando la respuesta de IFN-Beta y aparentemente retrasando la apoptosis en las etapas tempranas a la infección

viral (McFadden et al., 2011); si bien su ausencia no parece evitar la replicación del virus, si afecta la eficiencia de la infección (Borg et al., 2021).

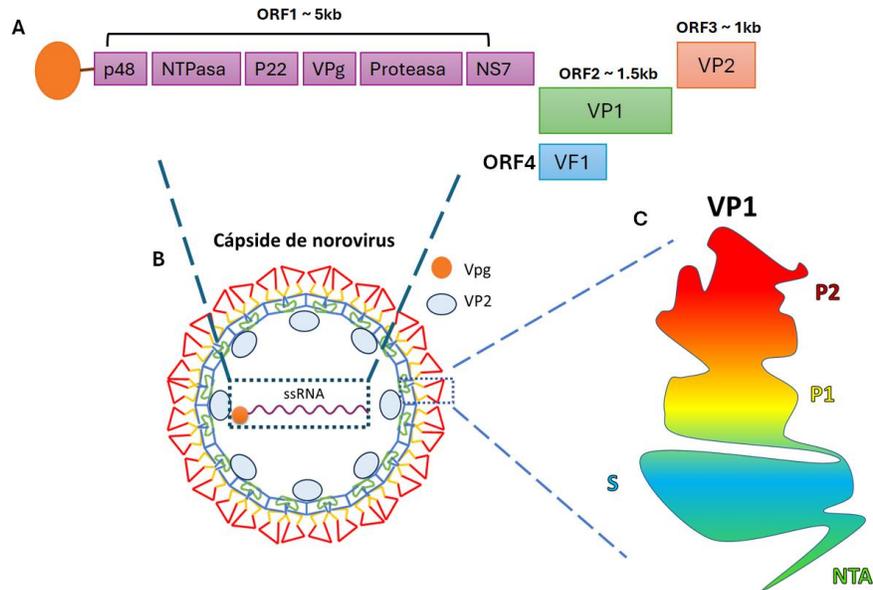


Figura 1. Estructura del norovirus.

A) Esquema representativo de la estructura de la cápside de norovirus murino. B) Esquema representativo de los dominios de la proteína mayoritaria de la cápside (VP1) de MNV. C) Representación esquemática de la organización genómica de MNV. ORF: Open Reading Frame (Marco de lectura abierto), VP2: proteína minoritaria de cápside, VF1: Factor de virulencia, ssRNA: RNA de cadena sencilla, VPg: Proteína de unión al genoma viral, S: Dominio Shell o de cubierta, NTA= Región N terminal.

### Proteínas no estructurales.

Las proteínas no estructurales, como su nombre lo indica, no forman parte del virión; sin embargo, participan activamente en la progresión del ciclo replicativo y en el establecimiento de la infección.

#### NS1/NS2.

Esta proteína puede ser sintetizada como una o dos proteínas, esto debido a que algunos calicivirus presentan un sitio de escisión que genera 2 proteínas

de aproximadamente 15 y 22 kDa (Meyers et al., 2000; Sosnovtsev et al., 2002); esta escisión puede ser llevada a cabo por la caspasa-3 (Sosnovtsev et al., 2006). Se localiza principalmente en el retículo endoplásmico, deformando la membrana de éste (Ettayebi & Hardy, 2003; Fernandez-Vega et al., 2004). Por otra parte, se ha demostrado que NS1/NS2 es clave para la persistencia de la cepa CR6 del MNV en ratón (Nice et al., 2013); se sugiere que lo anterior es debido a la capacidad de NS1 de evadir la respuesta de interferón lambda del huésped, permitiendo que MNV persista en las células epiteliales intestinales (IEC) del huésped.

### NS3 (P41)

La proteína NS3 es una helicasa con actividad de NTPasa, por lo cual una de sus funciones es hidrolizar el ATP para producir energía. Esta energía es utilizada para desenrollar la cadena de RNA durante la replicación, además funciona como una chaperona que permite remodelar la estructura del RNA y facilitar el reconocimiento de cadenas independientemente de NTP (Han et al., 2018; Li et al., 2018). Posee además un dominio de 4 alfa hélices en la región N- terminal y una señal de localización mitocondrial, esto le permite unirse a la cardiolipina lipídica de la membrana mitocondrial induciendo la muerte celular y permitiendo la liberación viral (Wang et al., 2023). Se sabe también que la proteína NS3 de norovirus participa en la formación de complejos replicativos, asociándose a lípidos y microtúbulos implicados en la replicación viral (Cotton et al., 2017).

### NS4

También llamada P22 o 3A. En células transfectadas con la proteína NS4, así como infectadas con MNV-1, esta proteína se localiza en endosomas y aparato de Golgi alterando la morfología de este orgánulo celular e induce la formación de vesículas de membrana simple y doble (Hyde & Mackenzie, 2010) (Doerflinger et al., 2017). Además, se sugiere que participa en el reclutamiento de membranas para la formación de los complejos replicativos (Hyde & Mackenzie, 2010).

### VPg (NS5)

Presenta un peso aproximado de 15 kDa, está unida covalentemente al extremo 5' del RNA viral similar a una estructura de "cap", y promueve el reclutamiento de los factores del inicio de la traducción para la síntesis de todas las proteínas virales. Asimismo, participa en la replicación del RNA viral. (Lee et al., 2018). Además, participa en el arresto de ciclo celular en la fase G0/G1 favoreciendo un entorno de replicación beneficioso (Davies & Ward, 2016; McSweeney et al., 2019).

### Proteasa (NS6)

Es una proteasa con un peso aproximado de 19 kDa, su función principal es procesar la poliproteína codificada por el ORF-1 y dar lugar a las proteínas maduras (May et al., 2013; Sosnovtsev et al., 2006). Al inducir su expresión en células transfectadas, se ha observado su localización en el citoplasma y en las mitocondrias celulares (Hyde & Mackenzie, 2010), debido a lo cual se ha sugerido que puede participar en la inducción de apoptosis durante la replicación viral (Hyde & Mackenzie, 2010).

### NS7 o RdRp

Es una polimerasa de RNA dependiente de RNA con un peso aproximado de 57 kDa, es la responsable de la síntesis del genoma viral durante la infección (Lee et al., 2011) (Shimoike et al., 2021). Dada la importancia de esta poliproteína en la replicación del virus, se ha vuelto un blanco importante para el desarrollo de compuestos inhibidores con el fin de combatir a los norovirus que causan la gastroenteritis en humanos (Obaid et al., 2023).

## **Proteínas estructurales.**

### VP1.

La proteína VP1 o mayoritaria de la cápside, es codificada en el segundo marco de lectura del genoma de MNV-1, está compuesta 2 dominios (**Figura 1C**): el dominio “P” o protruding, el cual se encuentra en la cara exterior de la cápside, que a su vez se subdivide en las regiones “P1” y “P2”; esta última, es la encargada de interactuar con los respectivos receptores en la membrana de las células. El dominio “S” o Shell, conforma la región N- terminal (NTA) de la proteína, este se encuentra en la cara interna de la cápside, este dominio puede interactuar con el RNA viral contenido en la cápside, permitiendo así su estabilización (Hardy, 2005).

VP2.

Es la proteína minoritaria de la cápside, que se encuentra en no más de 10 copias en las cápsides virales. Además, de participar en la infectividad viral, se ha propuesto que al menos en el FCV forma una estructura de portal para la liberación del genoma en el citoplasma celular (Hardy, 2005).

## **MARCO TEÓRICO:**

### **Modelos de infección**

Históricamente, el estudio de la biología y patogenia de los HuNoV se ha obstaculizado por la falta de modelos robustos que permitan generar títulos virales adecuados a partir de cultivos celulares. Dado lo anterior, se ha optado por utilizar a otros miembros de la familia *Caliciviridae* como modelos de estudio. Tal es el caso de calicivirus felino, que ha representado un modelo adecuado para norovirus, debido a que tanto su organización genómica como sus características fisicoquímicas son similares a la cepa de Norwalk virus, el cual causa la infección en el humano (Bidawid et al., 2003; Doultree et al., 1999; SLOMKA & APPLETON, 1998). Posteriormente, el descubrimiento del MNV, representó nuevas ventajas en el estudio no solo de la biología sino de la patogenia de estos virus, ya que éstos, al igual que los que infectan a humanos, son entéricos. Además, el MNV tiene una replicación eficiente en células dendríticas y macrófagos (lo cual asemeja a lo observado con algunas cepas de HuNoV); su tamaño de 28-35 nm, organización genómica, vía de

trasmisión (fecal-oral), la infección del tracto gastrointestinal, la eliminación en heces con títulos virales elevados y sobre todo el uso de un modelo animal más pequeño lo convirtieron en un modelo con mayores ventajas y similitudes a los HuNoV que otros calicivirus (Atmar et al., 2008; Grau et al., 2017; Mumphrey et al., 2007). Otro avance importante obtenido a través del uso del MNV como modelo de estudio, fue su cultivo en líneas celulares de linfocitos B (Ettayebi et al., 2016; Jones et al., 2014), lo cual representó un avance importante en el desarrollo de cultivos de HuNoV *in vitro* (Jones et al., 2014, 2015).

Así como el modelo del MNV favoreció el desarrollo de sistemas de propagación en cultivos en linfocitos B, el calicivirus entérico porcino (PEC) favoreció el cultivo en células epiteliales (Chang et al., 2005; Flynn et al., 1988). Los primeros intentos de cultivar HuNoV en líneas de células epiteliales no tuvieron éxito (Duizer et al., 2004). Sin embargo, posteriormente múltiples cepas de HuNoV GII se han logrado cultivar en monocapas de enteroides intestinales humanos (HIE) derivados de células madre (Ettayebi et al., 2016). Este cultivo está desarrollado a partir de HIE diferenciadas que consta de enterocitos, células endocrinas, células caliciformes y células de Paneth (Ettayebi et al., 2016). Otro modelo de cultivo basado en infección de células epiteliales fueron los organoides; sin embargo, los intentos iniciales de cultivos en organoides no tuvieron éxito (Herbst-Kralovetz et al., 2013). Los organoides a diferencia de los enteroides, son estructuras tridimensionales derivadas de tejidos primarios cultivados “como órganos” en nichos artificiales, por lo tanto, se asemejan al microambiente intestinal (Spence, 2018), sin embargo, el cultivo de norovirus tanto en HIE como en organoides aún debe mejorar en muchos aspectos.

Otra alternativa importante para el estudio de HuNoV es la utilización de un modelo de ratones humanizados, a los cuales se les injertaron células madre hematopoyéticas CD34+ humanas (Taube et al., 2013). Sin embargo, ninguno de los modelos desarrollados hasta ahora han podido replicar a los HuNoV de

manera conveniente, ya que el problema que se sigue presentando es la baja producción de partículas virales. Mientras que los HuNoV en linfocitos B y en los sistemas de organoides producen títulos virales  $10^2$  o hasta  $10^3$  veces (Jones et al., 2015; Wobus et al., 2004; Zhu et al., 2013); otros calicivirus cultivables producen entre  $10^7$  y  $10^8$  de partículas (Bidawid et al., 2003; Wobus et al., 2004), por lo que los modelos de cultivo del MNV y FCV siguen siendo los óptimos y robustos para el estudio de los calicivirus.

### **Tropismo de norovirus.**

Actualmente es bien conocido el tropismo de los norovirus tanto por células intestinales como por células del sistema inmunológico. Esto en gran parte se debe al uso de otros modelos como el MNV, lo cual ha permitido estudiar la patogenia de la infección, así como encontrar algunos candidatos de células blanco para los HuNoV. Los primeros descubrimientos sobre el tropismo del MNV por las células inmunitarias llevaron a determinar si éstas eran permisivas a la infección *in vitro* por los HuNoV.

En general los norovirus son virus intestinales, en el caso del MNV, éstos pueden generar una infección aguda o una infección crónica; la infección aguda, se inicia en el íleon y desde allí se propaga a otros sitios del intestino delgado y grueso, los ganglios linfáticos mesentéricos y el bazo (Gonzalez-Hernandez et al., 2014).

Durante las primeras 24 h de la infección, la replicación viral ocurre en tejidos linfoides asociados al intestino (p. ej., placas de Peyer), específicamente en macrófagos, células dendríticas, y linfocitos B y T (Grau et al., 2017), estas células no solo se infectan, sino que apoyan activamente la replicación del norovirus en el tejido linfoide asociado a intestino (GALT) (Grau et al., 2017). En especial las células T han presentado niveles altos de infección por HuNoV en comparación con otros tipos celulares, siendo un objetivo biológico para HuNoV (Karandikar et al., 2016).

La infección crónica se caracteriza por una infección persistente, y la eliminación continua del virus infeccioso durante los siguientes meses

(Thackray et al., 2007). Estudios realizados con la cepa persistente MNV-CR3, revelaron que la infección inicia en el ciego y luego se propaga al intestino delgado, el colon y los ganglios linfáticos mesentéricos (Gonzalez-Hernandez et al., 2014). Tanto la cepa aguda del MNV-1 como la cepa persistente MNV-CR3 superan la barrera epitelial intestinal utilizando las células M en el epitelio asociado al folículo que recubre las placas de Peyer (Gonzalez-Hernandez et al., 2014; Karst & Wobus, 2015; Kolawole et al., 2016). La detección de antígeno viral en células epiteliales intestinales sugirió que estas pueden ser blanco de la infección por norovirus; sin embargo, como se mencionó anteriormente, distintos intentos de replicar esta observación en cultivos celulares no han obtenido resultados óptimos (Herbst-Kralovetz et al., 2013; Takanashi et al., 2014).

#### *Células intestinales.*

Existen algunas células epiteliales que no son susceptibles a la infección por MNV, pero se ha demostrado que son importantes en el proceso de infección, tal es el caso de las células M, ya que la depleción de éstas afecta negativamente la infección de MNV en ratones BALB/C. Sin embargo, el virus no es capaz de replicarse dentro de ellas, por lo cual, es probable que únicamente se desplacen dentro de ellas por transcitosis para atravesar la barrera epitelial, (Gonzalez-Hernandez et al., 2014).

#### *Células del sistema inmunológico.*

Los primeros estudios respecto a la replicación de norovirus en células del sistema inmunológico se realizaron en chimpancés infectados con el HuNoV, que revelaron por primera vez que las células B duodenales y las células dendríticas eran positivas para las proteínas de la cápside (Bok et al., 2011), lo cual llevó a investigaciones adicionales para esclarecer si los HuNoV eran capaces de infectar células inmunológicas en cultivos *in vitro*.

Por otra parte, el tropismo del MNV por células dendríticas y macrófagos (Wobus et al., 2004), permitió crear un modelo eficiente para su cultivo

utilizando la línea celular de macrófagos Raw 264.7; sin embargo, estas células no fueron blanco para la infección por los HuNoV (Lay et al., 2010). Recientemente, se ha descrito el tropismo de norovirus tanto murino como humano por linfocitos B (Bok et al., 2011; Mumphrey et al., 2007), generando atención sobre estas células, dado que podrían ser utilizadas como modelo de infección para ambos virus (Jones et al., 2014); no obstante, actualmente no existe un modelo robusto para el cultivo de norovirus humano en linfocitos B.

### *Células Tuft.*

Los últimos estudios han considerado a las células de Tuft como la principal célula blanco para la infección por MNV (Wilén et al., 2018). Las células de Tuft, también llamadas de penacho o de cepillo (debido a que contienen un “mechón” de microvellosidades que sobresale en la luz intestinal) son un tipo de célula epitelial intestinal, que participan modulando la respuesta inmunológica contra helmintos (Gerbe et al., 2016), a través de la secreción de IL-25 (von Moltke et al., 2016). Se ha considerado que el tropismo a este tipo celular está dirigido principalmente por la expresión del receptor CD300lf el cual se ha definido como el receptor principal del MNV tema que se abordará más adelante.

El resumen de la información anterior se incluye en las tablas 1 y 2 extraídas del artículo de Sutonuka Bhar & Melissa K. Jones del 2019, en el cual se muestran las diferencias del tropismo celular entre los HuNoV y MNV (Bhar & Jones, 2019).

*Tabla 1. Resumen de los tipos celulares que soportan la replicación in vitro de norovirus humano (HuNoV) y norovirus murino (MNV). Extraído de (Bhar & Jones, 2019).*

Tipo celular	HuNoV	MNV
Células epiteliales	Si	No
Macrófagos	No	Si
Células dendríticas	No	Si

<b>Células B</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>
------------------	-----------	-----------

Tabla 2. Resumen de los tipos celulares por los cuales los HuNoV y los MNV tienen tropismo en pacientes inmunocompetentes o inmunocomprometidos.

Tipo celular	Norovirus humano (HuNoV)				Norovirus murino (MNV)			
	Tipo de huésped				Tipo de huésped			
	Inmunocompetente		Inmunocomprometido		Inmunocompetente		Inmunocomprometido	
	Aguda	Persistente	Aguda	Persistente	Aguda	Persistente	Aguda	Persistente
<b>Células epiteliales</b>	ND	ND	3	+4	+6	-7	+8	ND
<b>Células de Tuft</b>	ND	ND	ND	ND	ND	+7	ND	ND
<b>Macrófagos</b>	ND	ND	ND	ND	+6	ND	+8,9	ND
<b>Células dendríticas</b>	+2	ND	ND	+5	+6	ND	+8,9	ND
<b>Linfocitos B</b>	+2	ND	ND	-5	+6	ND	ND	ND
<b>Linfocitos T</b>	ND	ND	ND	+5	+6	ND	ND	ND

NOTA: En la columna 1 se muestran los distintos tipos celulares por los cuales norovirus humano (HuNoV) o norovirus murino (MNV) tienen tropismo. Los números y letras indican el tipo de estudio realizado: ND= tropismo no demostrado, 2= tropismo demostrado mediante la detección de Antígeno viral en secciones de tejido de chimpancé, 3= Tropismo demostrado mediante la detección de antígeno viral en secciones de cortes de tejido de cerdos gnotobióticos. 4= Tropismo demostrado mediante la detección de antígeno viral y proteínas no estructurales en biopsias de pacientes con gastroenteritis posterior a trasplante de células madre hematopoyéticas o trasplante de intestino delgado. 5= Tropismo demostrado mediante la tinción de antígeno viral en células y la detección de proteínas no estructurales en lamina propia de pacientes con gastroenteritis posterior a trasplante de células madre hematopoyéticas o trasplante de intestino delgado. 6= Tropismo demostrado mediante la tinción de antígeno viral e intermediario replicativo en ratones C57BL/6 7 inoculados vía oral con MNV-1. 7= Tropismo demostrado mediante la tinción para proteínas no estructurales en distintas cepas de ratones inmunocompetentes infectados con MNV por vía oral. 8= Tropismo demostrado mediante la detección de intermediario de replicación teñido en células epiteliales y lámina propia en ratones deficientes de STAT-1 inoculados por vía oral. 9= Tropismo demostrado mediante la tinción para antígeno viral en ratones deficientes de STAT-1 inoculados por vía oral. El signo + indica un tropismo celular detectado, el signo - indica un tropismo celular no detectado. Tabla extraída de (Bhar & Jones, 2019).

Si bien se han logrado enormes avances en el conocimiento respecto al tropismo de los distintos norovirus, no ha sido posible comprender por completo este proceso. Llama la atención el que al transfectar células no susceptibles a norovirus, se logra obtener replicación viral, por lo cual la limitante pudiera ser a nivel del receptor celular (Lay et al., 2010; Wilen et al., 2018). Dado lo anterior, es probable que, el problema radique en características propias de la cepa de norovirus y del microambiente en el huésped

### **Infección en linfocitos B**

Como se describió anteriormente, existe una variedad de células susceptibles a la infección por norovirus murinos y humanos; sin embargo, los linfocitos B son el único tipo celular que se ha demostrado ser blanco tanto del MNV como del HuNoV *in vivo*. El primer reporte que sugería a los linfocitos B como blanco de norovirus surgió del modelo de chimpancés infectados con HuNoV, donde se observaron células B duodenales positivas para la proteína de la cápside del HuNoV (Bok et al., 2011). Por otro lado, al evaluar un modelo de infección de MNV en ratones deficientes de IL-10, se encontró marca para antígeno viral en células de aspecto linfoide en placas de Peyer, aunque esto se limitó a una observación puntual (Basic et al., 2014). Observaciones posteriores correlacionaron la disminución de los títulos virales con la ausencia de linfocitos B y T en ratones Rag1<sup>-/-</sup>, lo cual sugería que estas son células blanco y su ausencia impactaba negativamente en los títulos virales (Zhu et al., 2013). El reporte más sólido es el realizado por Melissa K. Jones y colaboradores en 2014, en donde demostraron que tanto el MNV-1 como el MNV-3 pueden infectar las líneas celulares de linfocitos murinos Wehi-231 y M12, y alcanzar títulos virales comparables a los obtenidos en la línea de macrófagos Raw 264.7, pero en mayor tiempo, (aproximadamente un día posterior a lo observado en las células Raw 264.7) (Jones et al., 2014). Un dato relevante es que en las células Wehi-231 que corresponden a una línea celular de linfocitos B inmaduros, se indujo el efecto citopático, mientras que, en las M12, que corresponden a linfocitos maduros, no se observó. Esto podría deberse a

que los linfocitos inmaduros son más susceptibles o a que en las células Wehi-231 el porcentaje de infección osciló entre el 80 y 90%, al igual que en las RAW 264.7, mientras que en las M12 este porcentaje se limitó entre el 5 al 12%. Otro dato interesante fue que en las células M12 la infección por el MNV-1 se tornó persistente después de repetidos pases del cultivo, lo que sugería que los linfocitos B se pueden infectar persistentemente por MNV-1 (Jones et al., 2014). La infección de linfocitos B *in vivo* se demostró por la presencia de genoma viral en linfocitos B provenientes de placas de Peyer de ratones B6 inoculados con MNV-1 y esto se observó de mejor manera con ratones deficientes de STAT1. De la misma forma, los autores demostraron replicación del HuNoV en la línea celular BJAB, que corresponden a linfocitos B humanos; esta infección se favoreció por la adición de la bacteria *Enterobacter cloacae* la cual produce al antígeno de grupo sanguíneo HBGA de tipo H (Jones et al., 2014).

En trabajos posteriores, distintos grupos intentaron estandarizar modelos de cultivo para el MNV en células BJAB encontrando resultados variados y atribuyendo estas diferencias al estado de los linfocitos B previo a la infección, esto dado principalmente por el origen del suero fetal bovino utilizado (Jones et al., 2015). La obtención de títulos virales modestos ha impedido que éste sea considerado un modelo óptimo (Jones et al., 2015). En nuestro grupo de investigación, hemos abordado la infección de MNV-1 en linfocitos B provenientes de bazos de ratones C57BL6/J, demostrando que éstos son blancos para la infección *in vitro*; además, demostramos que esta infección es productiva (Miguel Rodríguez, 2018), lo cual concuerda con lo reportado por otros autores.

En resumen, existe evidencia fuerte de la infección de linfocitos B tanto por MNV como por HuNoV, sin embargo, todavía queda mucho por dilucidar respecto a cómo inicia esta interacción y la importancia biológica de la infección por MNV a estas células durante la infección *in vivo*.

## **Receptores para norovirus.**

### *CD300ld y CD300lf*

Para que un virus pueda interactuar con sus células blanco es necesaria la presencia de receptores celulares que le permitan adherirse a la célula y posteriormente ingresar a ella. Se han descrito 2 receptores principales para la entrada del MNV: el CD300ld y el CD300lf, pertenecientes a la familia de CD300 altamente homólogos, que difieren únicamente en su dominio citoplásmico. (Haga et al., 2016). Esta familia de proteínas tiene un único dominio extracelular de tipo variable de inmunoglobulina (IgV) que participa en la regulación de las respuestas inmunitarias, generando señales inhibitoras y activadoras (Borrego, 2013). Se ha demostrado su participación como receptores del MNV debido a que: 1) su transfección a células no permisivas a la infección por MNV las convierte en permisivas (Haga et al., 2016), y 2) a que el bloqueo del receptor CD300lf con un anticuerpo específico inhibe la unión del MNV a la célula blanco. Aunque ambos receptores tienen su homólogo en el humano, estos no participan en la unión de HuNoV a las células (Graziano et al., 2020). El receptor proteico para HuNoV aún no ha sido descrito.

### *Otros moléculas de unión.*

Se ha sugerido que CD44, CD36, CD98 y el receptor de transferrina pudieran participar en el proceso de entrada para el MNV, (Bragazzi Cunha & Wobus, 2016), ya que la ausencia de CD44 y CD36 afecta negativamente la unión de MNV-1 a células dendríticas de médula ósea; sin embargo, esto no ocurre con macrófagos derivados de médula ósea. Por otra parte, el silenciamiento de CD98 y TfR con siRNA específicos afecta la unión de MNV-1 a macrófagos de la línea celular Raw 264.7 (Bragazzi Cunha & Wobus, 2016).

### *Ácido siálico*

Existen otras moléculas no proteicas que se ha demostrado que funcionan en la entrada del MNV, tal es el caso del ácido siálico (Taube et al., 2009), esto

ocurre también para el HuNoV (Taube et al., 2009), siendo hasta el momento la única molécula que se ha descrito que participa en la entrada del HuNoV.

#### *Antígenos de grupo sanguíneo*

Algunos cofactores que participan durante el proceso de entrada de norovirus a las células blanco son los antígenos de grupo sanguíneo (HBGAs); éstos son carbohidratos que se unen a proteínas o lípidos en algunos tipos celulares, también se expresan en la superficie de algunas bacterias o secretados por las mismas (Rasko et al., 2000; Springer et al., 1961; Yi et al., 2005). Se ha demostrado que los HBGAs son importantes para la entrada tanto del HuNoV como del MNV en los linfocitos B (Jones et al., 2014; Karst, 2015; Singh et al., 2016); sin embargo, esto no ocurre en células epiteliales intestinales (Guix et al., 2007), lo que sugiere que su sola presencia no es suficiente para que ocurra la infección a las células, y por tanto es indispensable la presencia de un receptor de entrada, o de otro tipo de factores que favorezcan la entrada del virus.

#### *Otros cofactores*

Existen también otras moléculas que funcionan como cofactores para norovirus, y que participan a distintos niveles, por ejemplo, se ha demostrado que la unión del dominio P con el receptor CD300lf es relativamente baja (KD de  $\sim 25 \mu\text{M}$  para unión monotípica), sin embargo el tratamiento con las sales biliares tales como el ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA), que se unen a una hendidura en el dímero de la proteína de cápside VP1, mejora la unión de VP1 con el receptor CD300lf (Nelson et al., 2018), la evidencia sugiere la necesidad de uniones multivalentes entre el dominio P y varios receptores CD300lf de la superficie celular, por lo que la avidéz juega un papel clave en esta unión, en este sentido, los ácidos biliares estabilizan los dímeros de VP1, mejorando la interacción con CD300lf (Nelson et al., 2018).

Otro cofactor importante son los cationes como el calcio y el magnesio, la adición de éstos favorece la infección de MNV-1 ya que probablemente

participan en la unión directa entre VP1 y CD300lf (Nelson et al., 2018). Los ligandos de CD300lf murino son ceramida, fosfatidilserina y fosfatidilcolina los cuales se unen de manera dependiente de calcio (Choi et al., 2011), por tanto, es de esperar que la interacción de CD300lf con VP1 también dependa de calcio.

Con base en lo anterior es importante resaltar que existen muchas variables y factores que participan en la unión de norovirus a las células blanco, como el CD300lf, que se ha demostrado que es el receptor principal para el MNV; sin embargo, éste no participa en la unión/entrada para HuNoV, por lo cual es importante evaluar otras moléculas que participen en la entrada de norovirus murino a las células B y que puedan ser candidatos para participar también en la entrada de norovirus humano.

#### **CD44**

CD44 es una glicoproteína transmembrana, que originalmente se describió en células hematopoyéticas (Jalkanen et al., 1986), aunque actualmente se sabe que su expresión es ubicua (Fox et al., 1994). Participa principalmente en procesos de adhesión, proliferación celular, rearrreglos del citoesqueleto, migración, angiogénesis e inflamación (Chaffer & Goetz, 2018; Chen et al., 2020; Jalkanen et al., 1986; Senbanjo & Chellaiah, 2017; Zöller, 2011). El gen de CD44 está codificado en el cromosoma 11 en humanos y está compuesto por 19 exones; presenta distintas isoformas que se generan principalmente por splicing alternativo además de que sufren modificaciones postraduccionales (Fox et al., 1994; Zöller, 2011). El peso molecular de las isoformas varía entre 85 y 250 kDa (Maltseva & Tonevitsky, 2023). En linfocitos B la isoforma más abundante es la estándar (CD44s) (Gutjahr et al., 2015), con un peso entre 85 y 90 kDa y su principal ligando es el ácido hialurónico (Bradley & Anczuków, 2023).

En linfocitos B, CD44 es conocido como un marcador de activación celular, esto debido a que su expresión aumenta de 3 a 10 veces cuando están activados (Hathcock et al., 1993; Lesley et al., 1993).

CD44 se ha propuesto como una molécula de unión para MNV-1 en células dendríticas derivadas de médula ósea (Bragazzi Cunha & Wobus, 2016). En trabajos previos de nuestro grupo, demostramos que los linfocitos B son susceptibles a la infección por MNV-1 y que la activación de los linfocitos favorece esta infección, y sugerimos que esto se debía al aumento de moléculas en la membrana de los linfocitos B, así como a una mejor maquinaria de producción de proteínas en los linfocitos B activados (Miguel Rodríguez, 2018). Sin embargo, esto último no fue demostrado.

CD44 es una de las moléculas cuya localización en membrana es regulada por la miosina Myo1g. En trabajos previos en nuestro grupo, utilizando un ratón deficiente de Myo1g, demostramos que la ausencia de esta proteína generó una deficiencia en la localización de CD44 y en las balsas de lípidos en la membrana de los linfocitos B (López-Ortega & Santos-Argumedo, 2017), esto impactó en la polarización de CD44 (también llamado capping) y afectó la migración celular (López-Ortega & Santos-Argumedo, 2017)

### **Miosinas**

Las miosinas son proteínas motoras encargadas de mover cargos a través del citoesqueleto de actina (Hammer & Sellers, 2012; Titus, 2018). Originalmente, estas proteínas se describieron en la contracción muscular (Squire, 2016), y posteriormente, se observó su participación en distintas funciones celulares. En organismos eucariontes se han reportado hasta 35 clases de miosinas (Odrionitz & Kollmar, 2007), dependiendo de la especie, habiendo 12 clases en humano (Berg et al., 2001). Las miosinas se dividen en 2 grandes grupos, filamentosas y no filamentosas, entre estas últimas se encuentran las miosinas de clase I.

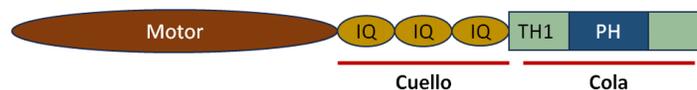
Las miosinas de clase I constan de una cadena pesada y un número variable de cadenas ligeras (Sellers, 2000). Además, éstas se dividen en 3 dominios principales, un dominio motor dependiente de ATP el cual puede unirse a actina filamentosa, un dominio de cuello, el cual contiene dominios IQ, que permiten la interacción con cadenas ligeras de calmodulina, regulando así la

movilidad de la proteína, finalmente una región de cola, la cual permite la interacción con fosfolípidos de membrana (Krendel & Mooseker, 2005).

Las miosinas de clase I pueden subdividirse a su vez en miosinas de cola corta y miosinas de cola larga, esto con base en la estructura de su región de cola. Tanto en humano como en ratón existen 8 genes que codifican para miosinas de clase I, seis miosinas de cola corta (Myo1a, b, c, d, g, h) y dos miosinas de cola larga (myo1e y f) (McIntosh & Ostap, 2016).

### **Myo1g**

Myo1g es una miosina de clase I de cola corta, se expresa exclusivamente en células hematopoyéticas (Girón-Pérez et al., 2019; Maravillas-Montero & Santos-Argumedo, 2011; Olety et al., 2010), su mayor expresión se observa en mastocitos y en linfocitos T y B (Cruz-Zárate et al., 2021; Gérard et al., 2014; Maravillas-Montero et al., 2014), tiene un tamaño de 1018 aminoácidos en humano y 1024 aminoácidos en ratón. Myo1g contiene un dominio PH en su región de cola (**Figura 2**), esto le permite unirse a la membrana plasmática interaccionando con los dominios ricos en fosfolípidos y colesterol denominados balsas de lípidos (Olety et al., 2010; Patino-Lopez et al., 2010; Santos-Argumedo et al., 2013). Myo1g participa en la interacción entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina, por tanto, participa en procesos que impliquen el rearrreglo del citoesqueleto de actina, procesos como la migración celular, endocitosis, reciclamiento de moléculas de membrana, interacciones célula-célula y secreción de citocinas (Cruz-Zárate et al., 2021; López-Ortega & Santos-Argumedo, 2017; Maravillas-Montero et al., 2014).



*Figura 2 Estructura de Myo1g.*

La myo1g contiene 3 dominios principales, un dominio motor (marrón), compuesto por una proteína con actividad de ATPasa; un dominio de cuello (amarillo), que consta de un número

variable de dominios IQ y un dominio de cola (verde y azul) compuesto por un dominio de (TH1) y un dominio de homología a pleckstrina (PH).

CD44 no es la única molécula cuya localización en balsas lipídicas se ve afectada por la deficiencia de Myo1g, también existen reportes de la disminución de LFA-1, CD62L y VLA-4 (Cruz-Zárate et al., 2021), sugiriendo que más de una molécula pueda verse afectada. Además, la endocitosis exacerbada de bacterias en linfocitos deficientes de Myo1g, sugiere alteraciones en el proceso de endocitosis celular (Maravillas-Montero et al., 2014).

### **JUSTIFICACIÓN:**

Actualmente no existen sistemas robustos para el cultivo de norovirus humanos (HuNoV), por lo cual, norovirus murino (MNV) sigue representando uno de los mejores modelos para estudiar su biología y patogenia. Los linfocitos B son susceptibles a la infección por HuNoV y MNV-1 y que la infección se ve favorecida al estimular los linfocitos B con LPS e IL-4; sin embargo, aún queda por dilucidar las moléculas que participan en esta interacción.

Se ha descrito a CD300Id y CD300If como los principales receptores para la entrada de MNV-1, sin embargo, se ha sugerido que este no participa en la unión en los linfocitos B, por lo que es necesario investigar otras moléculas que participen en la entrada de MNV-1 a este tipo celular. CD44 es otra molecular que participa en la unión de MNV-1 a células dendríticas y que se expresa en linfocitos B. Determinar si CD44 participa en la unión y entrada de MNV-1 a los linfocitos B contribuirá con el conocimiento acerca del tropismo de este virus en diferentes líneas celulares.

### **HIPÓTESIS:**

CD44 participa en la unión de MNV-1 a los linfocitos B.

## **OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar la participación de CD44 como una molécula de unión para MNV-1 en linfocitos B.

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Evaluar la expresión de CD300lf y CD44 en los linfocitos B.
- Evaluar si la expresión de CD300lf y CD44 aumenta durante la activación de los linfocitos B.
- Evaluar el impacto de la myo1g en la unión de MNV-1 a los linfocitos B.
- Evaluar la participación de CD44 en la unión de MNV-1 a los linfocitos B.

## **METODOLOGÍA**

### **Mapa de calor de expresión de moléculas de unión para MNV-1 en leucocitos.**

Se seleccionaron los posibles receptores o factores de unión para MNV-1 con base en la literatura, se buscó su expresión relativa en leucocitos de acuerdo con la información de la base de datos de <https://gexc.riken.jp/> se descargaron los datos normalizados de expresión y se realizó el mapa de calor con ayuda de GraphPad Prism versión 8.0.0, GraphPad Software, San Diego, California USA.

### **Aislamiento de células Mononucleares**

Se sacrificaron ratones C57BL/6J de 6-8 semanas de edad, se les extrajo el bazo, y se disgregó en una caja Petri con 10 ml de PBS estéril, con ayuda de una malla metálica y un embolo de jeringa y se separaron las células mononucleares mediante un gradiente de ficoll-hypaque (GE Healthcare Life Sciences, density 1.077 g/mL). Para ello, en un tubo cónico de 15 mL se colocaron 5 ml de ficoll-hypaque y se agregaron muy suavemente los 10 mL

de la suspensión de células de bazo, teniendo precaución de no romper la tensión superficial del ficoll. Una vez preparado el gradiente, se centrifugó a 300 gravedades durante 32 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 mononucleares se lavaron con PBS estéril y se centrifugaron a 300 x g por 5 min; los eritrocitos que contenía el botón de células se lisaron mediante la adición de 2 ml de buffer de lisis de eritrocitos (1X pH 7.3; NH<sub>4</sub>Cl 155mM, NaHCO<sub>3</sub> 1mM, EDTA 0.1mM, pH 8.0) se incubó la suspensión celular durante 3 min a temperatura ambiente; posteriormente se agregaron 5 ml de PBS estéril y se centrifugó a 300 x g durante 5 min.

### **Enriquecimiento de linfocitos B**

Las células mononucleares obtenidas se sometieron a una selección negativa mediante “panning” utilizando el líquido de ascitis de un anticuerpo contra CD90 murino (NIM-R1), para esto, 1 h antes del proceso se preparó una caja Petri de plástico con 10 ml de PBS y 10 µL de ascitis con NIM-R1 (dilución 1:500) y se incubó 1 h a 37°C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se agregaron las células mononucleares suspendidas en 5 ml de PBS, se incubó durante 1 h a 37°C, transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante en el cual se encontraban los linfocitos B. Por último, se contaron los linfocitos obtenidos mediante cámara de Neubauer y azul de tripano. De los linfocitos B obtenidos, la mitad se estimuló con LPS + IL-4 durante 48 h (10 µg de LPS + 10 ng de IL-4 por mililitro de medio RPMI suplementado al 10 % con suero fetal bovino), a las células no estimuladas, solo se les agregó medio RPMI suplementado al 10 % con suero fetal bovino.

### **Titulación de anticuerpos para bloqueo de CD44 y CD300lf.**

Para el bloqueo de CD44 se utilizó un sobrenadante de la clona IM7 y el anticuerpo purificado de la clona NIMR8, ambos monoclonales IgG de rata. Para la detección del receptor CD300lf se utilizó el anticuerpo policlonal IgG de conejo anti-CML1 (CD300lf) Mybiosource. Se tomaron 1 millón de linfocitos

B purificados y se bloquearon con 20% de suero de chivo durante 25 min en hielo, posteriormente, se lavaron las células con PBS 1X y se colocaron las siguientes diluciones de los anticuerpos:

*Tabla 3. Diluciones utilizadas para la titulación de los anticuerpos IM7 y NIM-R8 mediante citometría de flujo.*

IM7	NIM-R8	Anti-CD300lf
Sobrenadante directo	1:50	1:250
1:10	1:100	1:500
1:100	1:250	1:1000
1:500	1:500	1:2500
1:1000	1:1000	1:5000
1:5000		1:10000

Se incubaron los anticuerpos durante 25 min en hielo, posteriormente, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X, se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de rata-APC o anti-IgG de conejo-FITC y se incubaron 25 min en hielo. Se realizaron 2 lavados más con PBS 1X y posteriormente, las muestras se adquirieron utilizando citómetro SYSMEX XF-1600 y posteriormente se analizaron las intensidades de medias de fluorescencia de cada muestra utilizando el software FlowJo V10. De acuerdo con el análisis se seleccionaron las diluciones en donde se alcanzaba el punto de saturación del receptor, en el cual se encuentra la mayor intensidad media de fluorescencia.

### **Ensayo de bloqueo de moléculas de unión para MNV-1.**

Se tomaron 2 millones de linfocitos B y se bloquearon con anticuerpos específicos anti-CD44 (clona IM7 y NIM-R8) y anti-CD300lf, utilizando las diluciones en donde ocurrió la saturación de las proteínas. Se incubaron las células durante 30 min en hielo, posteriormente, se lavaron las células con PBS frío y centrifugando a 300 x g durante 5 min a 4°C. A continuación, se realizó el ensayo de unión o de infección de MNV-1 de acuerdo con lo que se indica a continuación.

### **Ensayo de Infección con MNV-1.**

Se tomaron 2 millones de linfocitos B no activados o activados y se suspendieron en 1 ml de medio RPMI base, se infectaron a una MOI de 5 con MNV-1 y se incubaron a 37°C durante 90 min en agitación; posteriormente, se centrifugaron las células a 300 x g durante 5 min a 25°C, se decantó el sobrenadante y los linfocitos se lavaron con PBS estéril. A continuación, las células se centrifugaron durante 5 min a 300 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 CO<sub>2</sub>. Después de las 48 h de incubación se centrifugaron las células a 300 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.

### **Ensayo de unión con MNV-1.**

Se tomaron 2 millones de linfocitos B purificados, se incubaron con MNV-1 a MOI de 100 durante 30 min en hielo, posteriormente, se lavaron las células con PBS frío y se centrifugaron 5 min a 300 x g a 4°C. Los botones celulares obtenidos se almacenaron a -70°C hasta su detección mediante qPCR o microscopía confocal.

### **Extracción de RNA.**

La extracción de RNA se realizó con BioPure RNA Isolation Kit y de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Posteriormente, se realizó la cuantificación del RNA mediante el equipo Qubit 3 y el kit RNA HS assay kit de Thermo Scientific y como se indica en el manual del usuario.

### **Detección de copias de MNV-1 mediante qPCR.**

Para la detección de MNV-1 mediante qPCR, se sintetizó el cDNA mediante la enzima LunaScript RT SuperMix Kit. Para lo cual se agregaron las siguientes cantidades:

Tabla 4. Concentraciones de reacción para obtención de cDNA

Reactivo	Para 20 µL de Reacción	Concentración final
<b>LunaScript RT SuperMix (5X)</b>	4 µL	1X
<b>Muestra de RNA</b>	variable	50 ng
<b>Agua libre de nucleasas</b>	Para 20 µL de Volumen final	

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

Tabla 5. Condiciones de ciclado para obtención de cDNA

Paso	Temperatura	Tiempo
<b>Alineamiento</b>	25°C	2 min
<b>Síntesis de cDNA</b>	55°C	10 min
<b>Inactivación por calor</b>	95°C	1 min

Con el cDNA obtenido se realizó la reacción de PCR en tiempo real, utilizando cebadores (primers) dirigidos contra la proteína NS7, las secuencias de los primers utilizados es la siguiente: primer sentido: 5'CCTCTATGCCAACACAGTGC3', primer reversa: 5' GCTAGGAGCCAGAGCAGTAA3', y la sonda: 5'-HEX- ACCCAGGCATTGCTGACAGGATGCA-BHQ-1- 3'.

Para la detección de actina se utilizaron los siguientes cebadores: Primer sentido: 5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3', primer reversa 5'- GCTAGGAGCCAGAGCAGTAA-3', y la sonda: 5'-Cy5- ACCCAGGCATTGCTGACAGGATGCA-BHQ-1-3'.

Para la reacción de PCR se utilizó el kit: Luna Universal Probe qPCR Master Mix, para lo cual se agregaron las siguientes cantidades:

Tabla 6. Concentraciones para reacción de qPCR

Componente	Para 20 $\mu$ L de reacción	Concentración final
Luna Universal Probe qPCR Mix	10 $\mu$ L	1X
Primer Forward (10 mM)	0.8 $\mu$ L	0.4 $\mu$ M
Primer Reverse (10 mM)	0.8 $\mu$ L	0.4 $\mu$ M
Sonda (10 mM)	0.4 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
DNA	8 $\mu$ L de reacción de cDNA	
Agua libre de nucleasas	Para 20 $\mu$ L de volumen final	

Las condiciones para PCR son las siguientes:

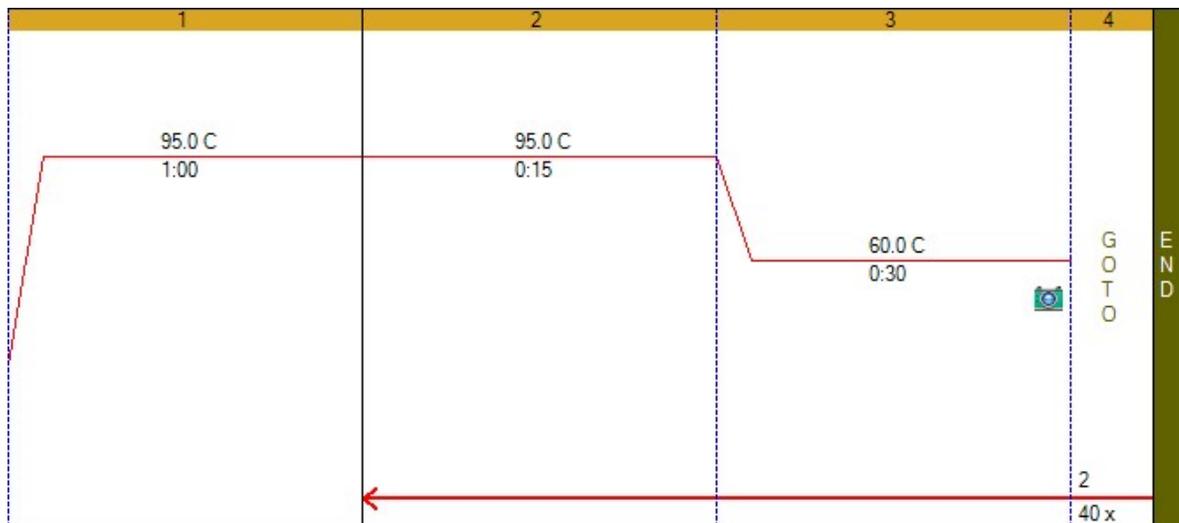


Figura 3. Condiciones de ciclado para qPCR.

Primer paso de 1 min a 95°C, segundo ciclo de 15 seg a 95°C, tercer paso de 30 seg a 60°C. GOTO: ir a, indicación de redirigir el proceso a un paso en específico. En este caso al finalizar el paso 3 se redirige al paso 2 y esto ocurre durante 40 veces o ciclos (Flecha roja). La lectura de la fluorescencia se realiza al final de cada ciclo. END: finalización del proceso.

### **Ensayo de microscopía confocal.**

Se colocaron 500 mil células por condición, se fijaron con para formaldehído PFA al 4% durante 10 min, se lavaron 1 vez con PBS y posteriormente, se bloquearon con 20% de suero de chivo durante 25 min en hielo. Se realizaron 2 lavados con PBS y se agregó el anticuerpo primario IgG de ratón anti-vp1 (dilución 1 en 100), se incubó durante 25 min en hielo, se realizaron 2 lavados con PBS 1x y se agregó el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón marcado con Cy3 (dilución 1 en 300), incubando durante 25 min en hielo. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con PBS 1X, se realizó la tinción nuclear con Hoechst 33342 (dilución 1 en 1000) durante 5 min y se realizaron 2 lavados más. Las células se montaron en cubreobjetos previamente tratados con Poli-L-Lisina (dilución 1:10 con agua Milli Q y secados hasta evaporación), las células se incubaron durante 30 min a 37°C y por último se colocaron en cubreobjetos colocando 3µL de VECTASHIELD® *Antifade Mounting Medium* y selladas con esmalte.

### **Obtención de proteínas de lisado celular.**

Las células infectadas se lisaron con 100 µL de buffer de lisis celular de SDS la cual contenía: 25mM de HEPES, 2 mM de EDTA, 25 mM de NaF, 1% de SDS. Al momento de usarlo se agrega la concentración necesaria de inhibidor de proteínas para tener una concentración final 1X (SIGMAFAST Protease Inhibitor Cocktail, EDTA Free). Se lisaron las células mediante sonicación y en hielo utilizando las siguientes condiciones de sonicación: 3 ciclos de 40 % de amplitud, 15 seg de sonicación y 10 seg. de descanso. Posteriormente, se cuantificaron las proteínas mediante el método de Lowry, se agregaron 20 µL de buffer Laemmli por cada 100 µL y se calentaron las muestras a 95°C durante 5 min. Finalmente, se colocaron las muestras en hielo y se cargaron en el gel, o en su defecto se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### **Ensayo de Western Blot**

Se cargaron 20 µg de proteína de las muestras obtenidas en las diferentes condiciones en un gel al 10 % de acrilamida. Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS en condiciones desnaturizantes a 80 voltios, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 1 h en cámara sumergible. Posteriormente, se bloqueó la membrana durante 1 h con solución de leche descremada al 5%, se lavó 3 veces (10 min por lavado) con TBS-tween (0.01%), y se colocó el anticuerpo primario IgG de conejo anti-NS7 en dilución 1:5,000 o el IgG de rata anti-NS7 en dilución 1 en 20 mil en solución de TBS-Tween y leche descremada al 5%. La membrana se incubó en el anticuerpo primario durante toda la noche, en agitación y a 4°C. A continuación, se lavó la membrana 3 veces con TBS-Tween y se colocó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con HRP en dilución 1:10,000 o anti-IgG de rata-HRP en la misma dilución en TBS-Tween y se incubó 1 h en agitación constante. Por último, se realizaron 3 lavados más con TBS-Tween y 2 lavados con TBS 1X. La membrana se reveló con luminol Clarity™ Western ECL Substrate (BIO-RAD), y la señal se adquirió con fotodocumentador Chemidoc™ MP Imaging System (BIO-RAD).

### **Ensayo de Plaqueo**

Para el ensayo de plaqueo, se utilizaron multiplacas de 24 pozos en las que se sembraron aproximadamente 200,000 células Raw 264.7 por pozo. Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado al 10 % de SFB. Cuando estuvieron en una confluencia de aproximadamente el 80 %, se realizó el ensayo de plaqueo según se indica a continuación. Se realizaron cuatro diluciones seriadas (1:10) a los sobrenadantes obtenidos posterior a la infección en los linfocitos B, para esto se agregaron 900 uL de medio DMEM base y 100 uL de la dilución anterior (Figura 4). Se retiró el sobrenadante a los macrófagos Raw 264.7 y se agregaron cuidadosamente 300 µL de cada una las diluciones por pozo, por duplicado. Se incubaron las placas durante 1 h a 37°C, a continuación, se retiró el sobrenadante de las placas, se agregaron

cuidadosamente 500  $\mu$ L de Carboximetilcelulosa y se incubaron las placas a 37°C durante 48 h.

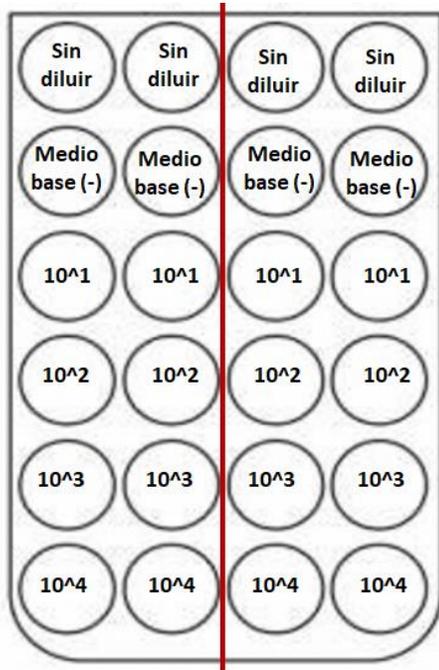


Figura 4. Esquema para ensayo de plaqueo en células Raw 264.7.

La placa de 24 pozos se dividió en 2 secciones para realizar el plaqueo de un sobrenadante por duplicado. Sin diluir: Muestra sin dilución. Medio base (-): control negativo en el cual solo se agregó medio DMEM base. Las diluciones fueron las siguientes: 10<sup>1</sup> = 1:10, 10<sup>2</sup> = 1:100, 10<sup>3</sup> = 1:1000, 10<sup>4</sup> = 1:10,000. Se comenzó con una dilución 1:10 agregando 1 parte de sobrenadante con 9 partes de medio base, esto se realizó de manera seriada durante 3 veces más, utilizando 1 parte de la dilución anterior y 9 partes de medio DMEM base.

## Desarrollo de anticuerpo anti-NS7

### Diseño de primers:

Para evaluar si CD44 y CD300lf son moléculas que están involucradas en la unión del MNV-1 en linfocitos B, es necesario tener las herramientas para detectar la infección de MNV-1. Para ello, utilizamos un anticuerpo contra la proteína NS7 que fue donado por el Dr. Ian Goodfellow; sin embargo, debido a que la cantidad de anticuerpo no era suficiente, decidimos elaborar un

anticuerpo anti-NS7. Para ello, realizamos primero la búsqueda de la secuencia de la proteína NS7 en la base de datos de PubMed, utilizamos la secuencia de NS7 contenida en el genoma de MNV GV con número de acceso: NC\_008311.1. La proteína NS7 tiene una secuencia de 510 aminoácidos que corresponde a un cDNA de 1529 pares de bases. Como vector de clonación, utilizamos PRSET en su marco de lectura A (**Figura 5A**), el cual contiene una etiqueta de histidina (6xHis). Utilizando el programa SnapGene by Domatics V6.2, analizamos los sitios de corte enzimático que contiene la secuencia del cDNA de NS7 (**Figura 5B**) y determinamos como sitios de corte para la clonación en PRSET A los de las enzimas a BamHI y EcoRI (**Figura 5A**), esto debido a que no se presentaban dentro de la secuencia del cDNA de NS7 y por tanto al digerir la construcción con estas enzimas, no se producirán cortes dentro de la secuencia de NS7 (**Figura 5 A y B**). Los cebadores para la amplificación de la secuencia de NS7 incluyen los sitios de corte de cada enzima; BamHI en primer del extremo 5' y EcoRI en primer del extremo 3', los cuales se resaltan en verde (**Figura 5C**). Se analizaron las características de los cebadores para determinar las Temperatura media ( $T_m$ ) predichas, el porcentaje de GC, su tamaño en nucleótidos, etc. (**Figura 5D**).

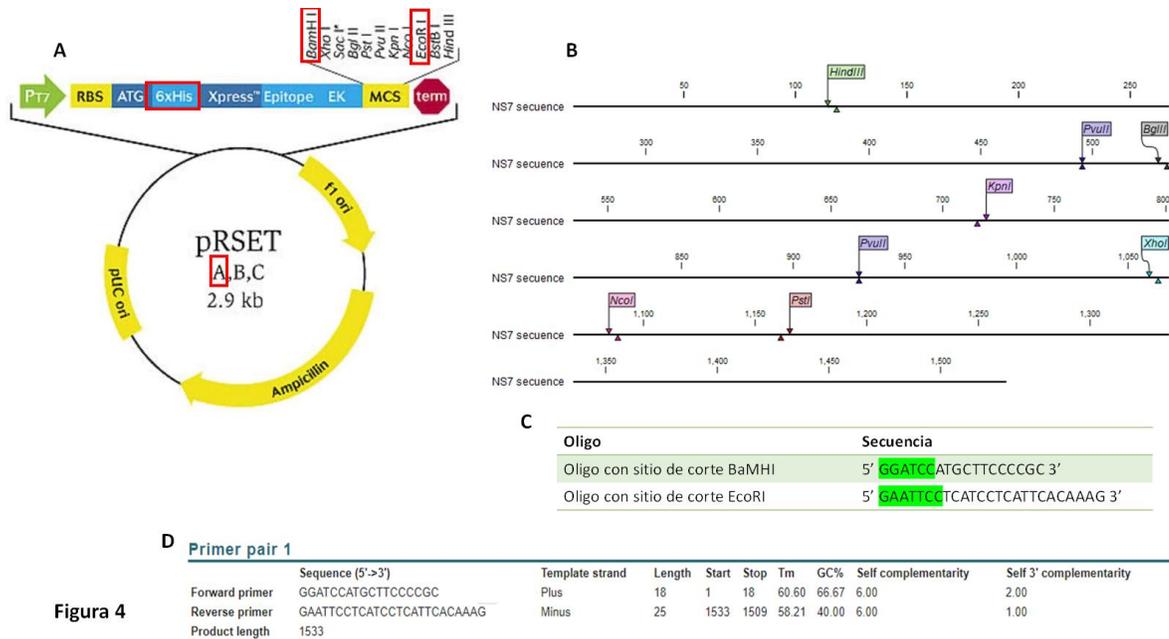


Figura 4

Figura 5. Análisis bioinformático para el diseño de plásmido pRSET A-NS7.

A) Estructura del plásmido pRSET A, B, C. Se utilizó la variante pRSET A, la cual contiene una etiqueta de 6xHis, los sitios de corte utilizados para los primers fueron BamHI y EcoRI. B) Análisis bioinformático de los sitios de corte encontrados en la secuencia que codifica para la proteína NS7, los sitios de corte para BamHI y EcoRI no se encontraron dentro de la secuencia de NS7. El análisis bioinformático se realizó con ayuda del programa “SnapGene software (www.snapgene.com)” C) Secuencias utilizadas para los “primers” que flanquean la región codificante para la proteína NS7, en verde se indican las secuencias que codifican para los sitios de corte BamHI y EcoRI los cuales se agregaron a cada primer. D) Análisis bioinformático de las características termodinámicas de los primers. El análisis se realizó con la calculadora “Tm calculator” ThermoFisher Scientific.

Los cebadores se sintetizaron en la empresa Oligo T4. Para determinar la mejor Tm de amplificación, se realizó un gradiente de temperatura utilizando como molde un cDNA purificado de MNV-1, encontrando como Tm óptima 52 y 55 °C (**Figura 6A**). Se utilizaron ambas temperaturas para realizar la amplificación de la secuencia del amplicón de NS7 utilizando la Platinum™ SuperFi™ II DNA Polymerase en las siguientes condiciones de PCR.

Tabla 7 Condiciones de PCR para clonación de secuencia de NS7

1.	95°C	5 min.
2.	95°C	30 seg
3.	52/55°C	30 seg
4.	68°C	1 min 30 seg
5.	35 ciclos de los pasos 2-4	
6.	68°C	5 min
7.	4°C	Infinito

### Clonación, expresión y purificación de la proteína NS7.

El amplicón se digirió durante 3 h a 37 °C primero con la enzima BamHI (New England Biolabs Cat: R0136S) y posteriormente, con la enzima EcoRI (New England Biolabs Cat: R0101S) en las siguientes condiciones:

Tabla 8. Condiciones de digestión enzimática.

<b>DNA</b>	<b>10 µl (1 mg)</b>
<b>10x CutSmart buffer.</b>	2.5 µl
<b>NEB. cat. # B7204</b>	
<b>Enzima BamHI o EcoRI</b>	1 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	11.5 µl
<b>Total</b>	<b>25 µl</b>

El resultado de la primera digestión se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y la banda de interés se purificó utilizando el kit: PCR purificación kit Jena Bioscience (Cat: PP-201S), siguiendo el protocolo del proveedor. Posteriormente, se realizó la segunda digestión enzimática con las condiciones indicadas en la tabla 8, el resultado de la digestión se purificó como se mencionó anteriormente. El producto de las digestiones enzimáticas se insertó en el vector de tránsito PJET utilizando el kit: Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit y las siguientes condiciones:

Tabla 9. Condiciones para ligación pJET1.2-NS7.

<b>DNA</b>	1 $\mu$ l (100 ng)
<b>Buffer de reacción 2X</b>	10 $\mu$ l
<b>DNA Blunting Enzyme</b>	1 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O</b>	6 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>18 <math>\mu</math>l</b>

Lo anterior se incubó durante 5 min a 70°C, posteriormente, se incubó en hielo durante 2 min y se agregó 1  $\mu$ l pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/ L) y 1  $\mu$ l de enzima T4 ligasa, en seguida se incubó en hielo 5 min a 22°C.

La ligación anterior se utilizó para transformar bacterias DH5 $\alpha$  como se describe a continuación:

1. Descongelar una alícuota de bacterias quimio competentes XL-10 Gold durante 5 min en hielo.
2. Agregar 5  $\mu$ L del producto de la ligación NS7-pJET1.2, incubar 5 min en hielo.
3. Realizar un choque térmico a 42°C durante 45 seg.
4. Incubar 2 min en hielo.
5. Agregar 450 mL de medio Luria-Bertani (BD Difco™ LB (Luria-Bertani) Broth Miller, cat. 244620) sin antibiótico e incubar 1 h a 37°C.
6. Sembrar en placa de agar LB con Ampicilina (100  $\mu$ g/mL) e incubar durante 20 h. a 37°C.

Se aislaron 2 colonias bacterianas y se extrajo el DNA mediante el kit “Plasmid Mini-Prep Kit - Column Kit (Cat: PP-204S)” y siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, se realizó digestión enzimática del DNA con las enzimas BamHI y EcoRI como se describió anteriormente, verificamos que se liberaran 2 fragmentos, uno de 3000 pb el cual correspondía al vector vacío PJET, el otro fragmento de 1500 pb que correspondía al tamaño de la secuencia de NS7 (**Figura 6B**). El producto de digestión se purificó del gel de

agarosa como se describió anteriormente y se realizó la ligación de NS7 con el vector PRSET A previamente linealizado como se describió anteriormente. A continuación, se transformaron bacterias DH5 $\alpha$  con el producto de la ligación. Se asiló el DNA de las colonias obtenidas y se verificó la presencia de la proteína NS7 mediante PCR (**Figura 6C**).

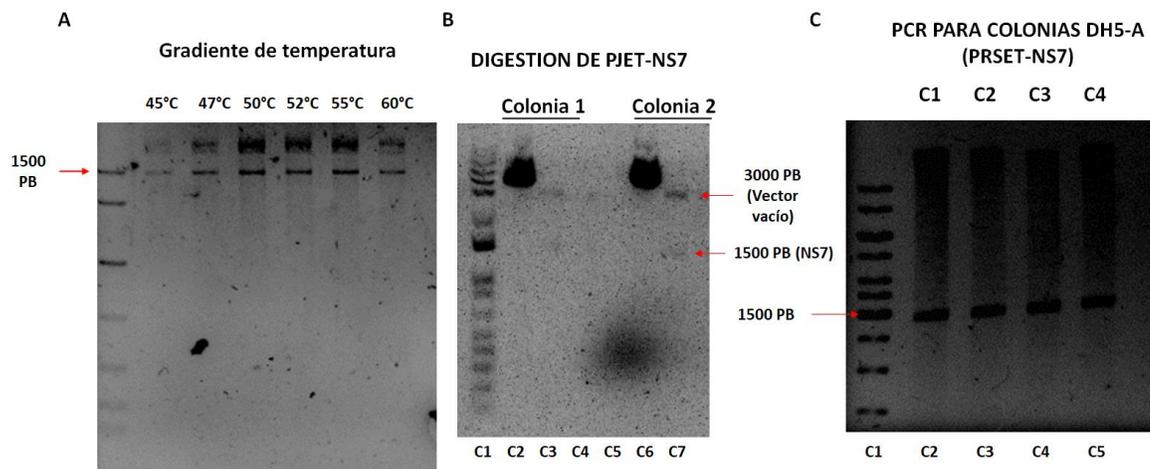


Figura 6. Clonación de proteína NS7 de MNV.

A) Gel de agarosa al 1% para el análisis en gradiente de temperatura de la amplificación de la secuencia que codifica para la proteína NS7 de MNV-1. Carril 1: Marcador de peso molecular, la flecha roja indica la banda de 1500pb. Carril 2-7 amplificación del fragmento a distintas temperaturas de alineamiento de primers. B) Gel de agarosa al 0.8% para el análisis de la digestión enzimática de la construcción PJET-NS7. Se realizó la digestión de los plásmidos de 2 colonias de bacterias DH5 $\alpha$  (Colonia 1 y Colonia 2) transformadas con el vector PJET-NS7, utilizando las enzimas BamHI y EcoRI. Carril 1: marcador de peso molecular de 10 kb. Carril 2: DNA plasmídico sin digerir de la Colonia 1. Carril 3: DNA plasmídico de la Colonia 1 posterior a la digestión enzimática. Carril 6: DNA plasmídico sin digerir de la Colonia 2. Carril 7: DNA plasmídico de la Colonia C2 posterior a la digestión enzimática. Las flechas rojas indican los pesos moleculares de los fragmentos esperados; fragmento de 3000 pb (Vector):

pJET linealizado), fragmento de 1500 pb (inserto de NS7). C) Gel de agarosa al 0.8% para la amplificación de la secuencia de NS7 a partir del plásmido de 4 colonias de bacteria DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido PRSET A-NS7. Carril 1: Marcador de peso molecular 10 kb. Carril 2: amplicón obtenido de la colonia 1. Carril 3: amplicón obtenido de la colonia 2. Carril 4: amplicón obtenido de la colonia 3. Carril 5: resultado de PCR de la colonia 4. La flecha roja indica el peso aproximado del producto de PCR. Las imágenes se obtuvieron mediante el equipo DNR BIO-IMAGING SYSTEMS MiniBis Pro.

El DNA obtenido de las dos clonas de PRSET A-NS7, se introdujo a bacterias de la cepa *E. coli* BL21(DE3) pLysS mediante transformación bacteriana como se indicó anteriormente, la expresión de la proteína se realizó utilizando IPTG 1mM durante 4 y 6 h como se indica en el protocolo de la página 59 de “The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged” (Qiagen, 2003). Posterior a la inducción con IPTG, las bacterias se resuspendieron en 5 mL de buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris·Cl, 6 M GuHCl. pH 8), se separó una alícuota de 100  $\mu$ L para corroborar la expresión de las proteínas. Ambas muestras se congelaron a -70°C hasta su utilización. Para corroborar la expresión de la proteína, se descongeló la alícuota de 100  $\mu$ L de bacteria inducida con IPTG, se agregó lisozima a una concentración final de 1mg/mL, se incubó durante 1 h en hielo, posteriormente se sonicó con 6 ciclos de 10 seg con pausas de 10 seg a 300 W. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 30 min a 4°C. Se obtuvieron 2 fracciones: el sobrenadante o fracción soluble y el pellet o fracción insoluble. Ambas fracciones se analizaron por electroforesis en geles de acrilamida teñidos con azul de Comassie (**Figura 7 A y B**).

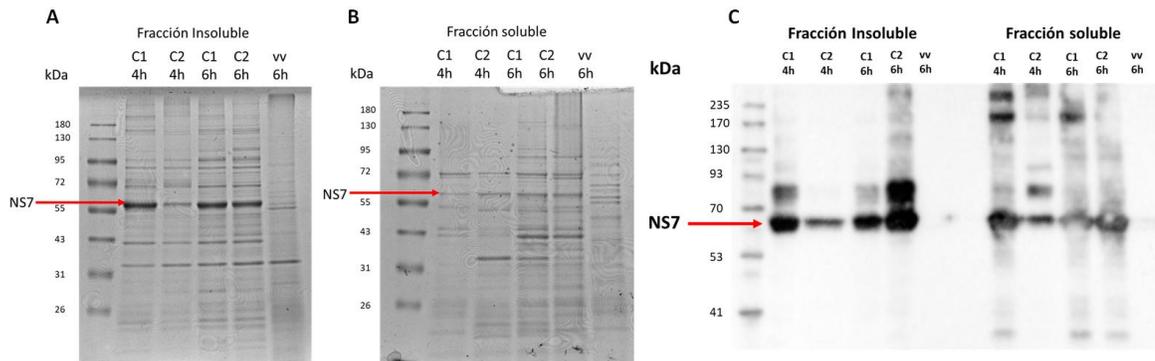
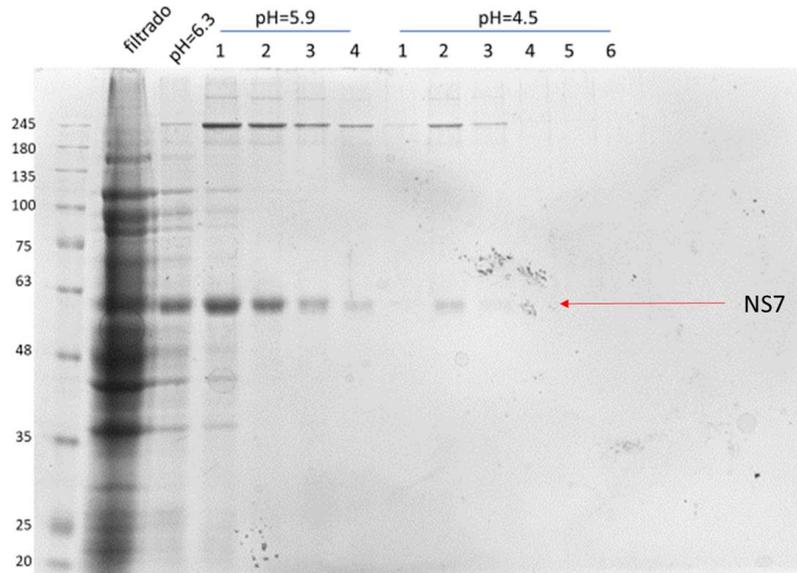


Figura 7. Expresión de la proteína NS7-6His en bacterias *DH5α*.

Gel de acrilamida al 12.5% teñido con azul de Coomassie para el análisis de la fracción insoluble (6A) y fracción soluble (6B) de bacterias *E. coli BL21(DE3) pLysS* que expresan la proteína NS7. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: Colonia 1 y carril 3: Colonia 2 inducidas durante 4 h con IPTG; carril 4: Colonia 1 y carril 5: Colonia 2 inducidas durante 6 h con IPTG; carril 6: lisado de bacteria transformada con vector vacío e inducida durante 6 h con IPTG. La flecha roja indica la banda de interés. C) Las fracciones solubles e insolubles se corrieron en un gel SDS-PAGE y posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa; la proteína NS7 se detectó con un anticuerpo específico, como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo HRP. Del lado izquierdo se muestran las fracciones insolubles y del lado derecho las fracciones solubles. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: Colonia 1 y carril 3: Colonia 2 inducidas durante 4 h con IPTG; carril 4: Colonia 1 y carril 5: Colonia 2 inducidas durante 6 h con IPTG, carril 6: lisado de bacteria transformada con vector vacío e inducida durante 6 h con IPTG. La flecha roja indica la banda de interés. La membrana se reveló utilizando Clarity™ Western ECL Substrate BioRad. Las imágenes se adquirieron en el equipo ChemiDoc™ MP Imaging System.

En las bacterias transformadas, encontramos una banda de aproximadamente 60 kDa, que corresponde al peso de la proteína NS7, la cual no se encontraba en las bacterias sin transformar. Esta banda era abundante en la fracción insoluble (**Figura 7A**), pero no en la fracción soluble (**Figura 7B**). Para corroborar que esta banda correspondía a la proteína NS7, realizamos un

Western Blot utilizando el anticuerpo anti-NS7 con el que aún contábamos y encontramos en los carriles de bacterias inducidas una banda de un tamaño aproximado de 60 kDa (**Figura 7C**), la cual no se encontraba en el control, por lo cual confirmamos que se trata de la proteína NS7.



*Figura 8. Purificación de la proteína NS7.*

Electroforesis en geles de acrilamida de las fracciones obtenidas en la purificación de la proteína NS7. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: fracción no unida a la columna, carril 3: Fracción eluída con buffer pH=6.3, carriles 4-7: fracciones 1,2,3 y 4 respectivamente de la elución con buffer pH=5.9, carriles 8-13: fracciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente de la elución con buffer pH=4.5. La flecha roja indica la banda de interés. Las imágenes a se adquirieron en el equipo ChemiDoc™ MP Imaging System.

Una vez confirmada la expresión de la proteína, procedimos a purificarla utilizando la resina de cobalto TALON Metal Affinity Resin, la cual permite la purificación de proteínas con etiqueta de histidina. La purificación se realizó mediante flujo por gravedad utilizando las columnas TALON His GraviTrap, y en condiciones desnaturizantes con buffer de UREA 8M con gradiente de pH como se describe en el protocolo 17 (Página 90) de “The QIAexpressionist™

A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged” (Qiagen, 2003), se recolectaron las distintas fracciones y se corrieron en un gel SDS-PAGE, el cual se tiñó con azul de comassie (**Figura 8**). Logramos purificar una proteína de aproximadamente 60 kDa, la cual corresponde con la proteína NS7, la cual no se encontró presente desde la fracción 1 del buffer de pH=5.9, aunque la mayor pureza se observó a partir de la fracción 2 del buffer pH=5.9. También se co-purificó una proteína localizada a la altura de 245 kDa. Dado que esta proteína sería inoculada posteriormente a animales, fue necesario intercambiar el buffer de urea en el que se encontraba, por lo cual se realizó el cambio de buffer mediante centrifugación utilizando los tubos Ultra-4 amicon de 40 kDa.

#### **Generación de suero policlonal de IgG de rata anti-NS7:**

Con la proteína NS7 purificada, se inocularon 2 ratas, realizando 5 inmunizaciones de 75 µg de la proteína NS7 por cada rata cada 15 días. La proteína se encontraba en buffer de PBS 1X y el adyuvante TiterMax en dilución 1:10. Quince días después de la cuarta inoculación, se tomó una muestra de suero previo y se realizó la quinta inoculación (**Figura 9A**). El suero, se tituló y una vez corroborada la presencia de anticuerpos contra NS7, se realizó el sangrado a blanco de las ratas, para lo cual se anestesiaron con isoflurano al 99.9% y utilizando el equipo VetEquip modelo IMPAC<sup>6</sup>, la configuración del equipo para la fase de inducción de la anestesia fue: dial a 4% de isoflurano y un flujo de oxígeno de 1 L/min. Para la fase de mantenimiento se utilizó el dial al 2% de isoflurano y un flujo de oxígeno de 0.8 L/min. El sangrado a blanco se realizó mediante punción cardiaca con aguja de 22 G y jeringa de 10 mL.

El suero de las ratas se tituló utilizando diluciones seriadas como se muestra en la **Figura 9B**. Se utilizaron lisados de células Raw 264.7 infectadas o no

con MNV-1, como sustrato. En la figura 9B se muestra la reactividad de uno de los 2 sueros, con una dilución máxima de 1:10 mil.

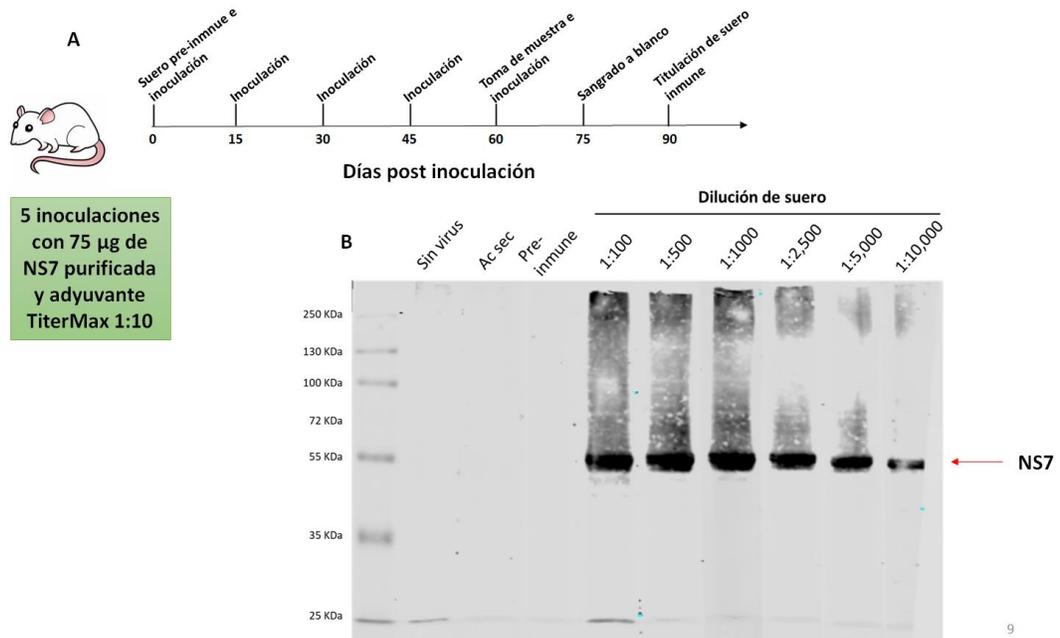


Figura 9. Realización de anticuerpo anti-NS7.

A) Esquema de inoculación de proteína NS7 en ratas. La escala indica los días transcurridos después de la primera inoculación. Día 0: Obtención de suero pre-inmune y administración de primera inoculación. Días 15, 30 y 45: segunda, tercera y cuarta inoculación respectivamente. Día 60: toma de muestra y administración de quinta inoculación. Día 75: sangrado a blanco. Día 90: Titulación de suero inmune. B) Titulación de suero de rata anti-NS7. Los lisados utilizados fueron los siguientes; carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: Lisado de células Raw 264.7 sin infectar. Carril 3-10 lisados de células Raw 264.7 infectadas con MNV-1. Los sueros de rata inmunes se colocaron de la siguiente manera; Carril 1 y 3: sin suero, carril 2: suero de rata anti-NS7 dilución 1:100, carril 4: suero de rata pre inmune dilución 1:10, carril 5-10: diluciones crecientes de suero inmune de rata anti-NS7, tal como se indican. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de rata acoplado a IRDye 800cw. Las imágenes se adquirieron en equipo Odyssey LI-COR imagen system.

Encontramos mediante ensayos de Western Blot que el suero inmune de ambas ratas (solo se muestra una), reconoce específicamente a la proteína NS7 de lisados de células infectadas.

## RESULTADOS:

### Los linfocitos B expresan moléculas de unión para el MNV-1.

En la literatura se ha descrito que los linfocitos B son permisivos a la infección con el MNV-1, esto se abordó en trabajos previos de nuestro grupo con linfocitos B de ratón (Miguel Rodríguez, 2018); sin embargo, hasta ha no se ha descrito cuales son las moléculas implicadas en el proceso de unión y entrada viral en estas células. Para que una célula sea permisiva a la infección por el MNV-1, es importante que expresen los factores que permitan la adherencia y posterior endocitosis del virus a la célula.

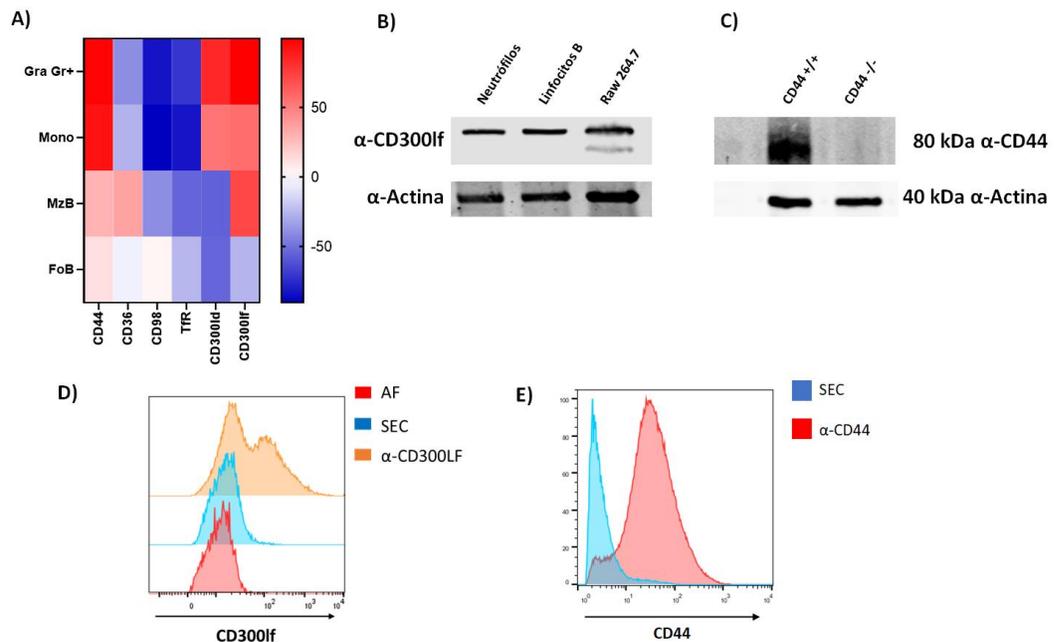


Figura 10. CD300lf y CD44 se expresan en los linfocitos B.

A) Mapa de calor de los distintos receptores para MNV-1 expresados en linfocitos B foliculares (FoB), linfocitos B de zona marginal (MzB), Monocitos (Mono) y Granulocitos (Gra Gr+). La expresión de los receptores se exploró con datos de <https://gexc.riken.jp> y el mapa de calor se generó utilizando el software GraphPad 8.0. B) Se obtuvieron extractos celulares de neutrófilos derivados de médula ósea, Linfocitos B de bazo de ratón o células Raw 264.7. Los niveles de CD300lf se evaluaron mediante Western Blot con un anticuerpo específico. La actina se utilizó como control de carga. C) Se obtuvieron extractos totales de linfocitos B esplénicos aislados de ratones de fenotipo silvestre (CD44+/+) o deficientes en CD44 (CD44-/-) y se determinaron los niveles de CD44 mediante Western Blot con un anticuerpo específico. La actina se utilizó como control de carga. D) Se aislaron linfocitos B esplénicos de ratones C57BL6/J las células se tiñeron con IgG de conejo anti-CD300lf y anticuerpo de IgG de cabra

anti-IgG de conejo marcados con FITC como anticuerpo secundario, los niveles de CD300lf se determinaron mediante citometría de flujo. Como control se utilizaron linfocitos B sin teñir (rojo) o teñidos solo con anticuerpo secundario (azul). E) Se aislaron linfocitos B esplénicos de ratones de fenotipo silvestre (CD44+/+) o (CD44-/-), las células se tiñeron con IgG de rata anti-CD44 (clona IM7) y APC IgG de cabra anti-IgG de rata como anticuerpo secundario, los niveles de CD44 se determinaron mediante citometría de flujo. Como control se utilizaron linfocitos B teñidos solo con anticuerpo secundario (azul). Las muestras se adquirieron en el citómetro Sysmex XF-1600, el análisis de las muestras se realizó mediante el software FlowJo™ v10.8 (BD Life Sciences).

Los datos de la literatura indican que CD300ld y CD300lf son los receptores principales para el MVN-1 en macrófagos de la línea Raw 264.7 (Haga et al., 2016; Nelson et al., 2018). Sin embargo, no existen reportes de la expresión de CD300ld y CD300lf en linfocitos B y la poca información con la que se cuenta es a través de bases de datos de mRNA. Por otra parte, se han descrito otros factores de unión como CD44, CD36, CD96 y TfR que pueden participar en la unión de MNV-1 a células dendríticas derivadas de médula ósea (Bragazzi Cunha & Wobus, 2016). De éstos, algunos se expresan en la membrana de los linfocitos B.

Para verificar cuales factores de unión para MNV-1 se encuentran en la membrana de los linfocitos B, realizamos la búsqueda de su expresión en la base de datos <https://gexc.riken.jp/>, comparándola en distintas poblaciones de leucocitos. Colocamos esta información en un mapa de calor (**Figura 10A**). Encontramos que la población celular que expresaba la mayor cantidad de CD300ld, CD300lf y CD44 son los granulocitos y monocitos.

Respecto a los linfocitos B de bazo, tenemos 2 principales poblaciones celulares: linfocitos B de zona marginal (MzB) y linfocitos B foliculares (FoB). La expresión de las moléculas de unión para MNV-1 parece ser distinta en ambas poblaciones. Esto debido a que los linfocitos B de zona marginal tienen una mayor expresión de CD300lf además de CD36 y CD44. Es por ello por lo que decidimos corroborar la expresión de CD300lf y CD44 mediante citometría de flujo y Western Blot (**Figura 10B-E**) debido a que en la literatura parecen

ser las moléculas más importantes para la unión de MNV-1 a las células (Bragazzi Cunha & Wobus, 2016; Graziano et al., 2020).

Utilizando lisados celulares de linfocitos B de bazo de ratón purificados, realizamos un Western Blot para detectar la expresión de CD300lf (**Figura 10B**) y CD44 (**Figura 10C**), encontramos la presencia de ambas moléculas en los lisados celulares de linfocitos B purificados. Decidimos corroborar la expresión de estas moléculas mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpos anti-CD19 para identificar a los linfocitos B y anticuerpos específicos para la detección de CD300lf (**Figura 10D**) y CD44 (**Figura 10E**). Para CD44 encontramos que toda la población de linfocitos B expresaba uniformemente esta molécula, esto en concordancia con lo descrito en la literatura. Respecto a CD300lf, encontramos dos poblaciones celulares, una que expresa a CD300lf y otra que no, en concordancia con lo encontrado en el mapa de calor. Para corroborar que la población con expresión de CD300lf correspondía a los linfocitos B de zona marginal, decidimos realizar una tinción con los marcadores CD19 y CD23, este último se expresa en los linfocitos B foliculares, pero no en los linfocitos B de zona marginal (**Figura 11**). Al comparar la expresión de CD300lf, encontramos que se expresa en los linfocitos B de zona marginal (CD19+CD23-) y no en los linfocitos B foliculares (CD19+CD23+) (**Figura 11 A-D**).

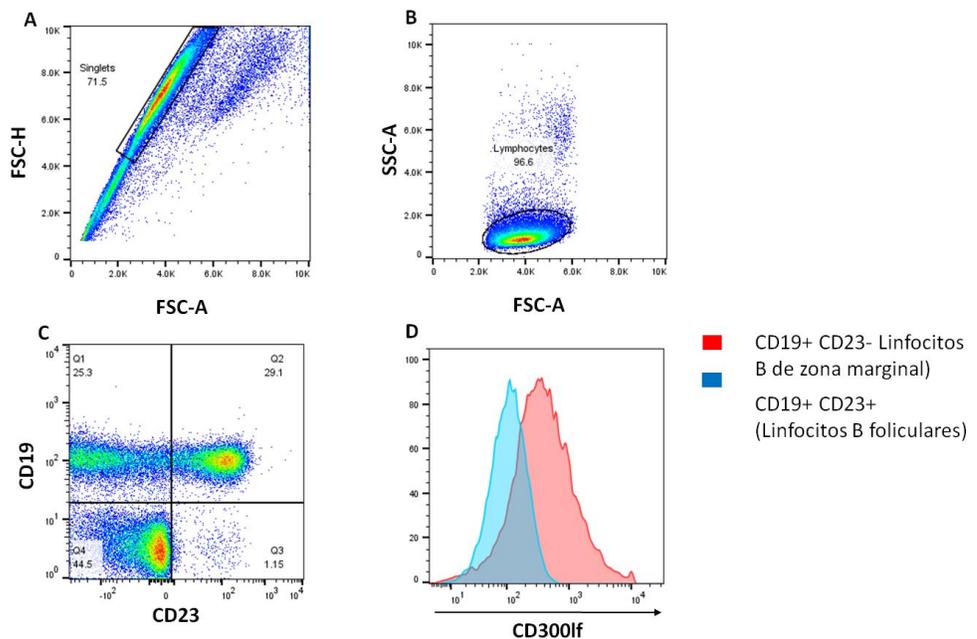


Figura 11. Expresión de CD300lf en la subpoblación de linfocitos B del bazo.

Se aislaron linfocitos B del bazo y se tiñeron con BV421 anti-CD19 y PE anti-CD23 para identificar linfocitos B. A) Se seleccionaron células individuales usando selección FSC-A y FSC-H. B) La zona de linfocitos se seleccionó usando FSC-A y SSC-A. C) Identificación de células B CD19+ CD23- Zona marginal (rojas) y células B foliculares CD19+ CD23+. D) Histograma de expresión de CD300lf en células B de la zona marginal y folicular. Las muestras se adquirieron en un citómetro Sysmex XF-1600 y se analizaron con el software FlowJo V10.9.

Los resultados anteriores demuestran que los linfocitos B de bazo de ratón expresan al menos 2 de las moléculas que participan en la entrada de MNV-1, además la expresión de CD300lf parece ser específica de los linfocitos B de zona marginal.

**La activación de los linfocitos B de ratón favorece la expresión de CD44, pero no de CD300lf en la membrana celular.**

Durante mi trabajo de maestría (Miguel Rodríguez, 2018), demostramos que la activación de los linfocitos B favorece la infección por MNV-1; en ese momento hipotetizamos que este aumento en la infección era consecuencia del aumento de factores de unión para MNV-1 en la membrana del linfocito B. Para corroborar esto, decidimos evaluar la expresión de CD300lf y CD44 en la membrana de los linfocitos B no estimulados y estimulados (**Figura 12**).

Encontramos que la expresión de CD300lf en la membrana de los linfocitos B, no aumenta como consecuencia de su estimulación (**Figura 12 A y C**); sin embargo, la expresión de CD44 en la membrana de los linfocitos B activados resultó mayor, como era de esperarse por lo descrito en la literatura (**Figura 12 B y D**), considerándose a CD44 un marcador de activación (Kremmidiotis & Zola, 1995). El aumento en la expresión de CD44 y no de CD300lf en la membrana de los linfocitos B activados correlaciona con un aumento en la infección por MNV-1, lo que sugiere que CD44 podría participar en la interacción de MNV-1 con los linfocitos B esplénicos de ratón.

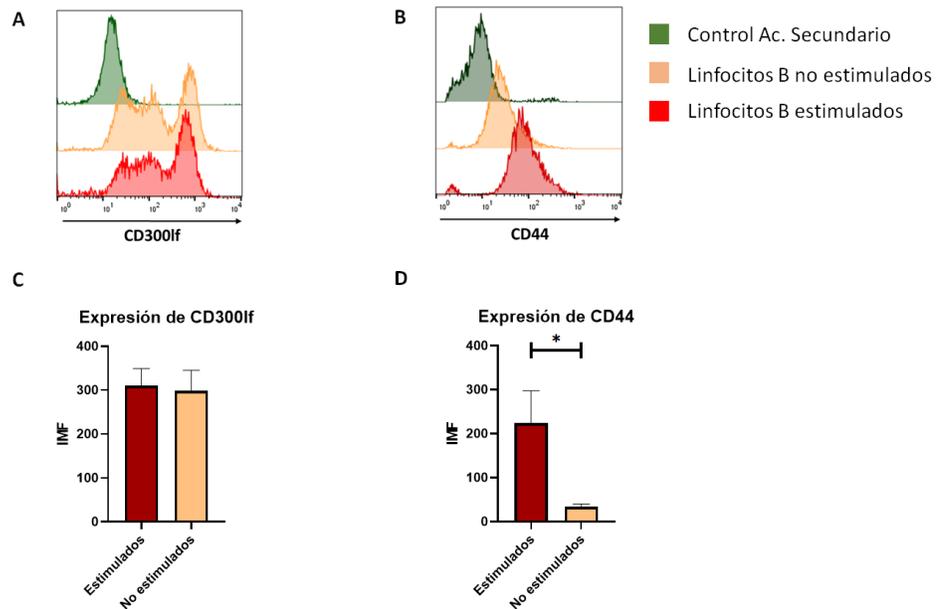


Figura 12. Expresión de CD300lf y CD44 en linfocitos B estimulados.

A) Linfocitos B no estimulados (naranja) y estimulados con LPS-IL4 (rojo) se tiñeron con IgG de conejo anti-CD300lf y anticuerpo IgG de cabra anti-IgG de conejo-FITC como anticuerpo secundario; como control se utilizó una muestra teñida únicamente con un anticuerpo secundario (verde). Los niveles de CD300lf se determinaron mediante citometría de flujo. B) Linfocitos B no estimulados (naranja) y estimulados con LPS-IL4 (rojo) se tiñeron con IgG de rata anti-CD44 y anticuerpo IgG de cabra anti-IgG de conejo-FITC como anticuerpo secundario; como control se utilizó una muestra teñida únicamente con un anticuerpo secundario (verde). La expresión de CD44 se determinó mediante citometría de flujo. Las muestras se adquirieron en el citómetro Sysmex XF-1600, el análisis de las muestras se realizó mediante el software FlowJo™ v10.8 (BD Life Sciences). C) Análisis estadístico de la expresión de CD300lf en linfocitos B estimulados (barra roja) y no estimulados (barra naranja). Las desviaciones estándar se obtuvieron de tres experimentos independientes. D) Análisis estadístico de la expresión de CD44 en linfocitos B estimulados (barra roja) y no estimulados (barra naranja).

Las desviaciones estándar se obtuvieron de tres experimentos independientes. Se indican los valores de  $p=0,0301$  (\*) calculados mediante prueba T Student. Las gráficas y el análisis estadístico se realizaron mediante el programa GraphPad Prism V 8.0.

### CD44 participa en la unión del MNV-1 a los linfocitos B de bazo de ratón.

La expresión de las moléculas de membrana para MNV-1 en linfocitos B, no demuestra que participen en el proceso de entrada de MNV-1 a estas células; por lo tanto, era importante corroborar si estas proteínas participan en este proceso.

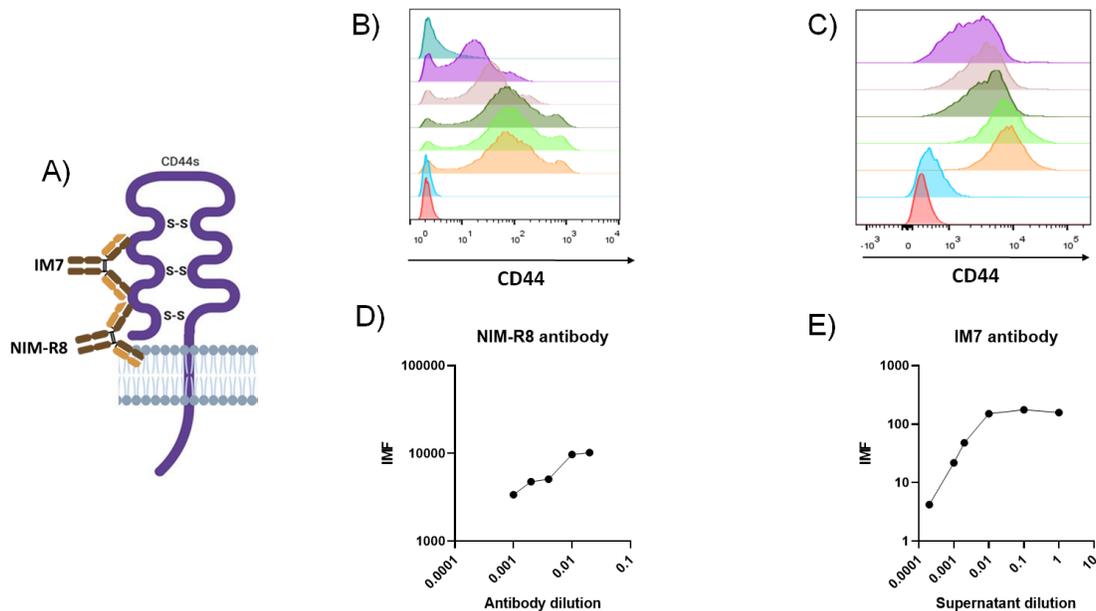


Figura 13. Titulación de anticuerpos específicos para CD44.

A) Esquema gráfico de la estructura de CD44 y de la región de interacción de los anticuerpos anti-CD44 clonas IM7 y NIM-R8. B y B) Los linfocitos B estimulados se tiñeron con diluciones seriadas de anti-CD44 de la clona IM7 (B) y NIM-R8 (C). Como control se utilizaron linfocitos B sin teñir (rojo) o teñidos solo con anticuerpo secundario (azul). Las muestras se adquirieron en un citómetro Sysmex XF-1600 y se analizaron con el software FlowJo V10.9 (BD Life Sciences). Las gráficas de titulación se realizaron en el software GraphPad Prism 8. D y E) Histogramas de intensidad media de fluorescencia de la titulación de anti-CD44 clona D) IIM7 y E) NIM-R8. En el eje horizontal se muestran las distintas diluciones de los anticuerpos y en el eje vertical se muestra la intensidad media de fluorescencia. Se realizaron 3 experimentos independientes (N=3), gráficas representativas de uno de los experimentos. Las gráficas de titulación se realizaron en el software GraphPad Prism 8.

Para ello, decidimos bloquear CD44 en los linfocitos B y determinar si se reducían los niveles de proteína NS7 y partículas virales. Los niveles de CD44 en la superficie de los linfocitos B se bloquearon utilizando 2 clonas de anticuerpos específicos, una dirigida al sitio de interacción de MNV-1 con su ligando (ácido hialurónico), denominada IM7, y otra clona que reconoce un sitio en la región N-terminal, llamada NIM-R8, (**Figura 13A**), la cual está adyacente al sitio de interacción con el ácido hialurónico.

Para realizar el bloqueo de CD44, primero titulamos los 2 anticuerpos utilizando diluciones seriadas de cada anticuerpo (**Figura 13 B-E**); encontramos que, para la clona NIM-R8 la dilución óptima era de 1:100 (**Figura 13 B y D**) y para la clona IM7, de 1:50 (**Figura 13 C y E**).

Para evaluar la participación de CD44 como una molécula implicada en la entrada para MNV-1, pretratamos a los linfocitos B con la clona IM7, con la clona NIM-R8 o con una mezcla de ambas. Como control utilizamos linfocitos B sin pretratamiento con anticuerpos o con IgG de rata como control de isotipo. Posteriormente, realizamos la infección con MNV-1 a una MOI de 5 durante 48 h y medimos la presencia de la proteína NS7 mediante Western Blot (**Figura 14A**). Encontramos que había una disminución significativa de la producción de proteína NS7 en las células pretratadas con la clona NIM-R8 o la mezcla de ambos anticuerpos, pero no con el anticuerpo IM7 (**Figura 14 A-B**), lo cual se debe a que son distintos los sitios que reconocen ambos anticuerpos, e indica que la interacción de MNV-1 puede ocurrir en el mismo sitio que reconoce el anticuerpo NIM-R8.

Para determinar si este bloqueo con anticuerpos afectaba también la cantidad de virus liberado al medio, evaluamos el título viral en los sobrenadantes de las células infectadas (**Figura 14C**). Encontramos una reducción en los títulos virales cuando utilizamos estos anticuerpos IM7, NIM-R8 o ambos, aunque esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa.

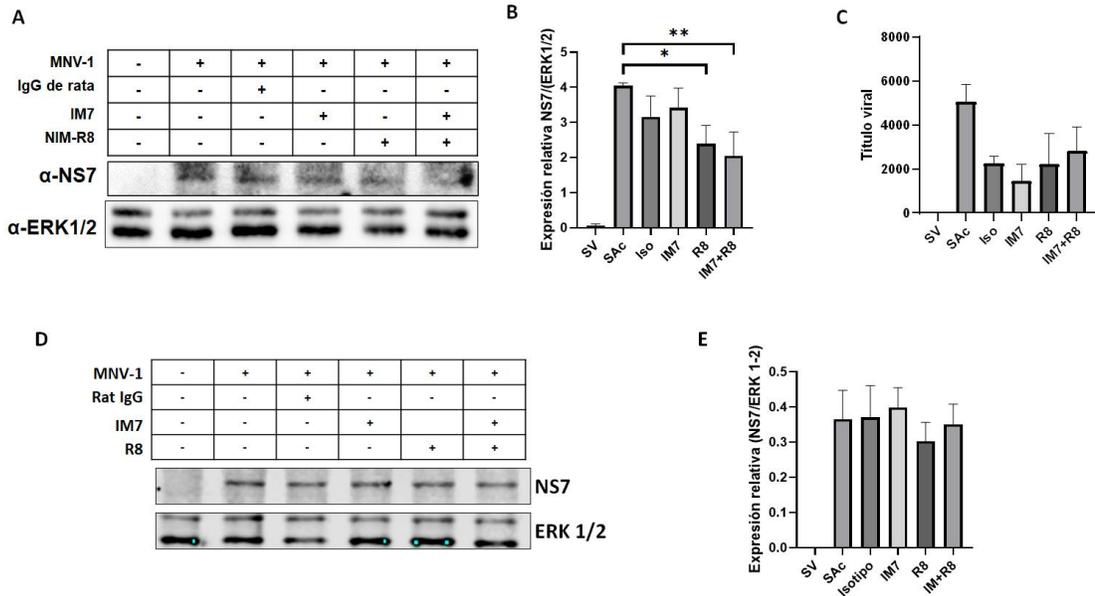


Figura 14. CD44 es un factor de unión para MNV-1 en los linfocitos B.

A) Extractos proteicos totales de linfocitos B estimulados tratados con anticuerpos anti-CD44 (IM-7 y NIM-R8) o el control de isotipo, infectado o no con MNV-1 a una MOI de 5 durante 24 h se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y los niveles de proteína viral NS7 se analizaron mediante Western Blot. Se utilizó actina como control de carga. B) Las intensidades de las bandas de NS7 de las imágenes escaneadas se cuantificaron utilizando el software ImageJ y se muestran como expresiones relativas. Las desviaciones estándar se obtuvieron de tres experimentos independientes. Se indican los valores de  $p=0,0131$  (\*)  $p=0,0032$  (\*\*) calculados mediante ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 8.0. C) Se obtuvieron sobrenadantes de linfocitos B estimulados tratados con anticuerpos anti-CD44 (IM-7 y NIM-R8) o el control de isotipo infectado o no con MNV-1 a una MOI de 5 durante 48 h en y la cantidad de virus asociado a al sobrenadantes se analizó por ensayos de plaqueo en células Raw 264.7. D) Extractos proteicos de la línea celular A20 de linfocitos B tratados con anticuerpos anti-CD44 (IM-7 y NIM-R8) o el control de isotipo, infectado o no con MNV-1 a una MOI de 5 durante 24 h se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y los niveles de proteína viral NS7 se analizaron mediante Western Blot. Se utilizó ERK 1/2 como control de carga. E) Las intensidades de la banda de NS7 de las imágenes escaneadas se cuantificaron utilizando el software ImageJ y se mostraron como expresiones relativas. Las desviaciones estándar se obtuvieron de tres experimentos independientes. mediante ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 8.0. Incluir los valores de P.

Con la finalidad de determinar el papel de CD44 en un modelo de infección de linfocitos B más robusto, decidimos evaluar este proceso en la línea celular A20 (linfocitos B de ratón), con el que hemos obtenido una mejor eficiencia de

infección que los linfocitos B primarios. Utilizamos las mismas condiciones de bloqueo de CD44 que las anteriormente descritas; sin embargo, tampoco encontramos diferencias significativas en las distintas condiciones de bloqueo de CD44 en relación con la infección sin anticuerpos (**Figura 14 D-E**). Lo anterior puede deberse a distintas variables, primero: que la concentración de anticuerpos para el bloqueo de CD44 no fue el óptimo; segundo: que la medición de la proteína NS7 posterior a las 24hpi no es la más adecuada para este tipo de ensayos, en ese sentido la medición por qPCR para determinar la cantidad de virus unido puede aclarar dichas dudas.

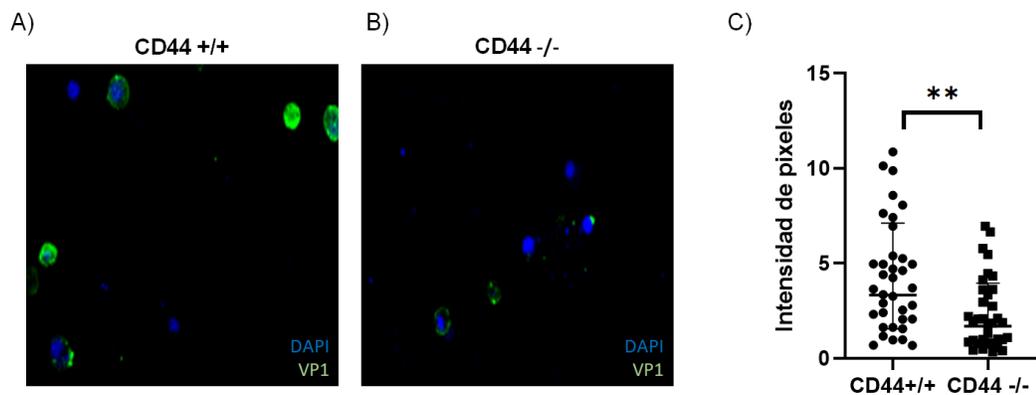


Figura 15. Los linfocitos B deficientes de CD44 presentan menor unión de MNV-1.

A) Linfocitos B aislados del bazo de ratones A) de fenotipo silvestre (CD44+/+) o B) deficientes de CD44 (CD44-/-) se incubaron con MNV-1 a una MOI de 100 durante 30 min a 4 °C, y la expresión de VP1 (verde) se detectó mediante ensayos de inmunofluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las imágenes se obtuvieron utilizando el microscopio confocal Leica SP8. C) El análisis estadístico de la intensidad media de píxeles por célula se obtuvo utilizando el programa Uniovi ImageJ-Fiji. Las desviaciones estándar se obtuvieron de tres experimentos independientes. Se indican los valores de  $p=0,0012$  (\*\*) calculados mediante prueba T utilizando el software GraphPad Prism 8.0.

En los experimentos de bloqueo de CD44 previo a la infección con MNV-1, se observó únicamente una disminución de la proteína NS7 del MNV 1. Una posibilidad es que el bloqueo de CD44 con los anticuerpos utilizados fuera parcial. Por lo anterior; decidimos utilizar un modelo de linfocitos B provenientes de ratones deficientes de CD44 y evaluar la unión del MNV-1 (**Figura 15**). Para esto realizamos un ensayo de unión y mediante microscopía confocal, evaluamos la cantidad de virus unido las células. Medimos la intensidad de pixeles en ambas condiciones y encontramos que los linfocitos B deficientes de CD44, presentaron una reducción significativa de la intensidad de la señal de VP1 comparado con los ratones de fenotipo silvestre (Figura 15); esta correlación entre la ausencia de CD44 y una menor detección de VP1 indica que de CD44 participa en la entrada viral del MNV en linfocitos B. Sin embargo, el hecho de encontrar marca en los Linfocitos B CD44 (-) sugiere que otras moléculas podrían participar en la unión y entrada del virus a las células.

#### **La ausencia de Myo1g afecta la localización de moléculas de unión para MNV-1 en la membrana de linfocitos B.**

La presencia de moléculas involucradas en la unión y entrada del MNV 1 en la membrana de los linfocitos B es indispensable para que ocurra el proceso de infección. La miosina 1g es una molécula que se encarga de movilizar cargos a través del citoesqueleto de actina, uno de ellos es CD44. En nuestro grupo de trabajo hemos reportado la participación de Myo1g en la localización de CD44 en la membrana de los linfocitos ya que la ausencia de Myo1g produce una disminución de CD44 en la membrana de linfocitos B estimulados. Sin embargo, hasta ahora no existen reportes que correlacionen alguna miosina con la localización de CD300lf en la membrana de los linfocitos B. Por tanto, decidimos evaluar el efecto de la deficiencia de Myo1g en la localización de CD44 en la membrana de los linfocitos B (**Figura 16 A y B**).

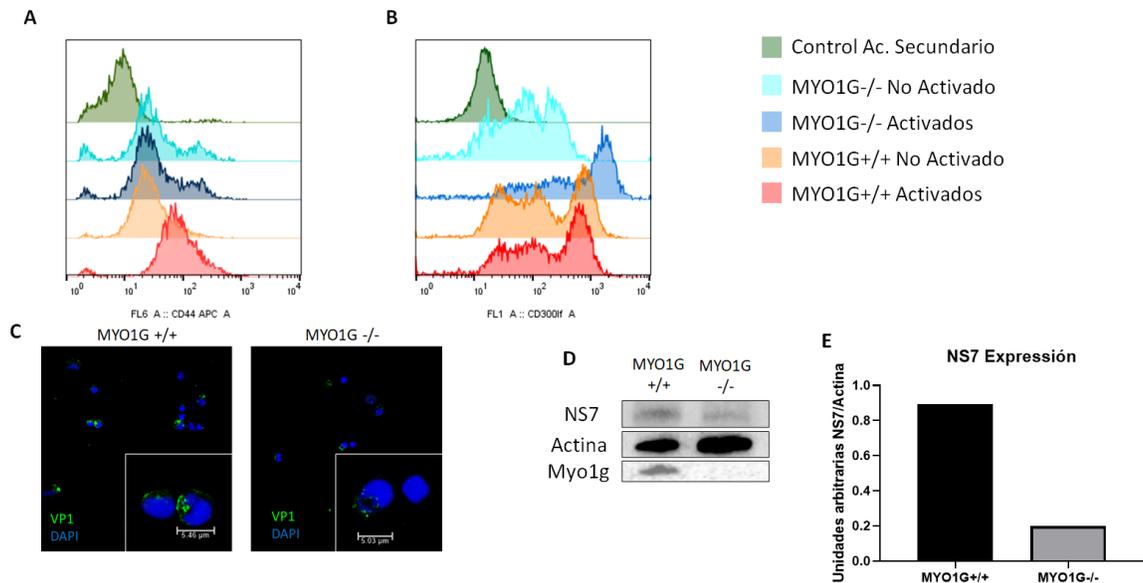


Figura 16. La deficiencia de *Myo1g* afecta la unión de MNV-1 en los linfocitos B.

A-B) Linfocitos B provenientes de bazo de ratón C57BL6/J de fenotipo silvestre MYO1G (+/+) fueron estimulados (Rojo) o no (Naranja) con LPS + IL-4, paralelamente linfocitos B provenientes de bazo de ratón C57BL6/J deficientes de *myo1g* (MYO1G<sup>-/-</sup>) fueron estimulados (azul oscuro) o no estimulados (azul claro) con LPS + IL-4. Los linfocitos fueron teñidos con los anticuerpos primarios: Rata IgG anti-CD44 (A) o Conejo IgG anti-CD300lf (B), como anticuerpo secundario se utilizó Anti-rata APC o Anti-conejo FITC. La expresión de ambas moléculas se determinó mediante citometría de flujo, como control secundario se utilizó una tinción con únicamente el respectivo anticuerpo secundario (Verde). Las muestras se adquirieron en el citómetro Sysmex XF-1600, el análisis de las muestras se realizó mediante el software FlowJo™ v10.8 (BD Life Sciences). C) Linfocitos B aislados de bazo de ratón de fenotipo silvestre (MYO1G<sup>+/+</sup>) o deficientes de *myo1g* (MYO1G<sup>-/-</sup>) se incubaron con MNV-1 a una MOI de 100 durante 30 min a 4 °C, a continuación, las células fueron fijadas y teñidas con DAPI (Azul) para la visualización del núcleo y VP1 (verde) para la detección de la proteína viral mediante inmunofluorescencia. Las imágenes se obtuvieron utilizando el microscopio Leica SP8 y las imágenes fueron procesadas mediante el software LAS X. D) Se obtuvieron extractos proteicos totales de linfocitos B MYO1G<sup>+/+</sup> o MYO1G<sup>-/-</sup> estimulados e infectados con MNV-1 a MOI de 5 durante 24h. La cantidad de proteína viral NS7 se analizó mediante Western Blot. La actina se utilizó como control de carga. E) Gráficas de expresión relativa de la proteína NS7 en linfocitos B MYO1G<sup>+/+</sup> o MYO1G<sup>-/-</sup> infectados con MNV-1, se realizó el análisis densitométrico de 2 experimentos independientes, las intensidades de las bandas fueron analizadas mediante el software ImageJ. Las gráficas se realizaron con el software GraphPad Prism 8.0.

Mediante citometría de flujo, medimos la expresión de ambas moléculas en la membrana de los linfocitos B no estimulados y estimulados con LPS + IL-4 (Figura 16A). En los ensayos con linfocitos B provenientes tanto

de ratones silvestres (MYO1G +/+) como de ratones deficientes en miosina (MYO1G -/-) no estimulados, no encontramos diferencia en la expresión de CD44 en la membrana. Sin embargo, cuando estimulamos a los linfocitos con LPS + IL4, encontramos menor cantidad de CD44 en la membrana de los linfocitos B deficientes de Myo1g que en la de los linfocitos de fenotipo silvestre (Figura 16 A). Lo anterior en concordancia con lo reportado anteriormente por nuestro grupo de trabajo.

Por otro lado, en los linfocitos B de fenotipo silvestre estimulados con LPS + IL-4 no se afectó la cantidad de CD300lf en la membrana en relación con los no estimulados. En el caso de los linfocitos B deficientes de Myo1g que no fueron estimulados, se detectó una menor cantidad de CD300lf en membrana en relación con los de fenotipo silvestre; pero al ser estimulados, la cantidad de CD300lf en la membrana fue mayor que en los linfocitos B de fenotipo silvestre (**Figura 16B**). Este resultado es inesperado, y dada la falta de antecedentes de la interacción de Myo1g y CD300lf, será importante evaluar a detalle este fenómeno.

### **Myo1g participa en el proceso de entrada de MNV-1 a los linfocitos B.**

Los resultados anteriores mostraban una clara participación de Myo1g en la localización de CD44 y CD300lf en la membrana de los linfocitos B, por lo tanto, decidimos evaluar si la ausencia de esta proteína afectaba la unión de MNV-1 a los linfocitos B. Para ello, realizamos un ensayo de unión con linfocitos B provenientes de ratones de fenotipo silvestre o deficientes de Myo1g y la cantidad de virus unido se evaluó mediante la detección de la VP1 de MNV-1 en la superficie celular por microscopía confocal (**Figura 16 C**). Como se esperaba, encontramos una menor cantidad de marca de la proteína VP1 en los linfocitos B de los ratones deficientes de Myo1g que en los de fenotipo silvestre (Figura 16 C).

Para determinar si esta reducción en la unión del MNV 1 en los linfocitos B de los ratones deficientes de Myo1g, se traducía en una menor infección de las células, evaluamos la cantidad de proteína NS7 del MNV 1 en linfocitos B de

ratones de fenotipo silvestre y deficientes de Myo1g infectados con MNV-1 por Western Blot (**Figura 16 D y E**). Encontramos que la cantidad de la proteína NS7 del MNV 1 en los linfocitos B de los ratones deficientes de Myo1g fue significativamente menor, en comparación con la detectada en los linfocitos B de fenotipo silvestre, lo cual sugiere una menor infección en los mismos. Estos resultados sugieren que la proteína Myo1g participa durante el proceso de entrada de MNV-1; sin embargo, queda por demostrar en que punto o puntos de este proceso puede estar participando, dos de estos procesos pueden ser la tensión de membrana, un factor importante en la endocitosis de moléculas o directamente en la movilización de moléculas de membrana para la unión de MNV-1.

## **DISCUSIÓN.**

Los HuNoV representan un problema de salud pública mundial, dada su alta incidencia, la gran variabilidad de serotipos y la falta de vacunas efectivas para su control y prevención (Bartsch et al., 2016). Históricamente, la falta de modelos robustos para su propagación ha dificultado su estudio, y aunque actualmente existen mejores sistemas como los cultivos tridimensionales y los organoides, estos todavía son altamente costosos y difíciles de manejar (Bhar & Jones, 2019; Ettayebi et al., 2016). Es por ello por lo que el uso de modelos animales como el FCV y el MNV siguen siendo relevantes para conocer su biología y patogenicidad. La gran diversidad de células blanco que pueden ser infectadas *in vivo* tanto por el MNV como por los HuNoV nos lleva a preguntarnos ¿Cuáles son los componentes clave que determinan su tropismo celular? Dado que las moléculas de entrada son el principal componente de especificidad de tejido, la identificación del receptor o los receptores celulares para el MNV-1 ha sido clave para entender este proceso.

El uso de los linfocitos B ha cobrado relevancia en el estudio de los norovirus, esto debido a que se ha demostrado que se infectan con los HuNoV (Jones et al., 2014), e incluso representan un buen sistema para su replicación (Jones et al., 2015). Sin embargo, poco se ha estudiado sobre como ocurre la primera

interacción entre los HuNoV y los linfocitos B, es decir, se desconoce aún cuales son las moléculas implicadas en la unión y entrada. Reportes de otros grupos de trabajo han demostrado que los antígenos de grupo sanguíneo son importantes para esta interacción (Jones et al., 2014), pero aún quedan por identificarse las moléculas de membrana implicadas en la infección.

Los receptores de entrada para los HuNoV no se han identificado aun y aunque se conoce que CD300ld y CD300lf son los principales receptores para el MNV (Haga et al., 2016; KATAYAMA, 2017), se ha descartado su participación en la entrada de los HuNoV (Graziano et al., 2020). Otras moléculas como CD44, CD36, CD98 y TfR han sido propuestos como candidatos para el MNV-1 (Bragazzi Cunha & Wobus, 2016), pero su participación en la entrada de los HuNoV no se ha evaluado.

Dada la variedad de células que pueden infectarse *in vivo* con MNV 1, es posible que distintas moléculas participen en este proceso, por lo que en el presente proyecto nos enfocamos en analizar algunas proteínas de membrana que podrían participar en este proceso, basado en moléculas presentes en la superficie de los linfocitos B y cuya expresión aumente cuando éstos son estimulados.

Existen 2 bases de datos principales que evalúan la expresión de moléculas en células del sistema inmunológico, estas son Riken (<https://gexc.riken.jp/>) e Immgen (<http://www.immgen.org>). Si bien ambas bases se enfocan en células del sistema inmunológico del ratón, éstas tienen algunas discrepancias. Por ejemplo, en la base de datos de Riken no se reportan las poblaciones de linfocitos B intestinales (datos no mostrados) por otra parte, Immgen si reporta dichas poblaciones. Tomando en cuenta los datos de esta última, pudimos determinar que los linfocitos B intestinales tienen una mayor expresión de las moléculas CD44, CD36, TfR y CD300lf comparado con los linfocitos B esplénicos. A pesar de lo anterior, decidimos trabajar con linfocitos B provenientes de bazo de ratón debido a que, en trabajos previos de nuestro grupo, demostramos que estos son susceptibles a la infección *in vitro* por

MNV-1 (Miguel Rodríguez, 2018). Además, existe evidencia de la presencia de genoma de MNV<sup>cw3</sup> en el bazo de ratones, lo cual sugiere que, en algún momento los linfocitos B esplénicos pueden estar en contacto con el virus *in vivo* (Nice et al., 2013). Aunado a ello, la facilidad de obtener un mayor número de linfocitos del bazo en comparación con el intestino provee una ventaja técnica.

Al evaluar la expresión de moléculas de membrana que participan en la unión de MNV-1, encontramos que las poblaciones de linfocitos B de bazo expresan de manera distinta las proteínas que participan como moléculas de unión para MNV-1. Los linfocitos B de zona marginal expresan de manera importante CD300lf, CD44 y CD36, mientras que los linfocitos B foliculares en reposo, no presentan CD300lf y presentan una menor densidad de CD44 y CD36. Esto nos podría indicar que los linfocitos B de zona marginal pueden ser más susceptibles a infectarse por MNV-1 o que además podrían infectarse a través de moléculas distintas. Sin embargo, es necesario realizar los ensayos necesarios para corroborar esto. Por ejemplo, realizando ensayos de citometría de flujo utilizando marcadores para las distintas poblaciones y un anticuerpo específico para la cápside de MNV-1.

CD300lf es un receptor que pertenece a la familia de CD300, con un papel importante en la homeostasis del sistema inmunológico. Se considera que CD300lf es un receptor inhibitor porque bloquea la señalización de TLR mediada por MyD88 y TRIF mediante la activación de SHP-1 (S.-M. Lee et al., 2011). También se ha reportado que puede inhibir a BAFF y por tanto regular la inflamación (S.-M. Lee et al., 2010). Por tanto, CD300lf podría participar de manera importante en la regulación de la activación de los linfocitos B. En este trabajo demostramos la expresión de CD300lf en los linfocitos B de zona marginal y no en los linfocitos B foliculares, aportando el primer reporte de la expresión diferencial de CD300lf en poblaciones de linfocitos B de bazo. Esto podría implicar que, de ser CD300lf responsable de la interacción de MNV-1 con el linfocito B, los linfocitos B de zona marginal serían más susceptibles a

la infección por MNV-1; a futuro será necesario confirmar experimentalmente la relevancia de este dato en la infección *in vivo*. Esperamos poder abordar dicha hipótesis en trabajos futuros, debido a que no existen reportes del tropismo de MNV-1 por subpoblaciones específicas de linfocitos B, sobre todo en poblaciones intestinales y evaluar la función que éstas tienen en el proceso de infección.

Respecto a el papel de la activación celular en la infección, en trabajos anteriores demostramos que ésta favorecía la infección por MNV-1, lo cual resulta relevante en el intestino, particularmente en las placas de Peyer, donde las poblaciones celulares se encuentran en un estado continuo de activación celular debido al contacto constante con antígenos (Yu et al., 2021). En ese sentido, los linfocitos B esplénicos activados se asemejan más a las condiciones en las que se encuentran los linfocitos B intestinales.

CD44 es una glicoproteína que tiene distintas isoformas, las cuales se generan por splicing alternativo (LOH et al., 2015); la isoforma expresada en los linfocitos B es la estándar. Se han caracterizado varias clonas de anticuerpos para CD44, entre otras, la clona IM7 que reconoce al sitio de interacción de CD44 con su ligando (ácido hialurónico), y la clona NIM-R8 que reconoce una secuencia al final del dominio N-terminal. El bloqueo de CD44 de linfocitos B infectados con la clona NIM-R8, pero no con la clona IM7 tiene como consecuencia en la infección viral, generando una disminución en la producción de la proteína viral NS7 (**Figura 14**). Esto sugiere que el sitio de reconocimiento de MNV-1 con CD44 ocurre en la región reconocida por el anticuerpo NIM-R8, es decir en la región N-terminal. Si bien esta región no es el sitio de reconocimiento con ácido hialurónico, el reconocimiento por el anticuerpo NIM-R8 puede producir cambios conformacionales en la membrana de los linfocitos (SANTOS-ARGUMEDO et al., 1997). Por lo cual, la interacción del MNV 1 en esta región probablemente podría inducir su endocitosis, o en su defecto modular la expresión de otras moléculas que funcionen como receptor de endocitosis. Por otra parte, la discrepancia en los ensayos de

western blot respecto a la producción de progenie viral puede deberse a características en el mecanismo de infección y liberación de MNV-1 en linfocitos B, se ha observado que cuando MNV-1 infecta linfocitos B de la línea celular M12, no se observan efectos citopáticos visibles, además de observarse una infección persistente tanto por MNV-1 como MNV-3, en consecuencia, se generan títulos constantes de progenie viral (Jones et al., 2014). En consecuencia, es probable que los títulos virales puedan equipararse a lo largo del tiempo en el sobrenadante de cultivo, en ese sentido, sería relevante investigar la cantidad total de la progenie o en su defecto realizar mediciones de progenie viral en distintos tiempos.

La discrepancia entre los resultados de bloqueo de CD44 en linfocitos B primarios y la línea celular A20 podrían ser explicados si CD44 funcionara como una molécula de cebado, es decir, no un receptor de endocitosis propiamente. Su función podría limitarse a generar una primera interacción entre el MNV-1 y el linfocito B, y de esta manera el virus podría interaccionar con el receptor que inducirá su endocitosis. Las células A20 expresan receptores de endocitosis porque son susceptibles a la infección por MNV-1, no necesariamente se trata de los mismos receptores.

Los resultados con linfocitos B deficientes de CD44 corroboran que esta molécula es clave durante el proceso de entrada para MNV-1; sin embargo, será importante dilucidar si su función es de un receptor de endocitosis o un receptor de cebado. Además, la disminución parcial y no total de la infección sugiere que no es la única molécula que participa en la entrada de MNV-1 y que probablemente otras moléculas participen en este proceso.

Por último, cuando evaluamos la participación de Myo1g en la movilización de CD44 y CD300lf en la membrana de los linfocitos B, encontramos que en los linfocitos B deficientes de Myo1g que fueron estimulados con LPS + IL-4, la expresión de CD300lf aumentó considerablemente. Este resultado no era esperado y debido a los pocos reportes de CD300lf en la función de los linfocitos B, no podemos hipotetizar mucho respecto de ello. Será importante

estudiar la participación de CD300lf en los distintos procesos en los que está implicada la Myo1g, tales como tensión de membrana, migración y reciclamiento celular.

Al realizar la infección en linfocitos B provenientes de ratones deficientes de Myo1g, esperábamos encontrar una mayor infección debido al aumento de CD300lf en la membrana; sin embargo, encontramos una disminución significativa tanto en la unión viral, como en la infección, lo cual correlaciona con lo observado con el ratón deficiente de CD44. Esto puede significar que en los linfocitos B, CD300lf no sea la única molécula que participa en la entrada de MNV-1 y que CD44 también participe en dicho proceso. Otra explicación es que la miosina1g participe tanto en el proceso de entrada, como en el de replicación de MNV-1. En este sentido, es bien sabido que un proceso clave para la infección de MNV-1 es la formación de complejos replicativos, los cuales se generan por la proliferación de las membranas celulares internas, como el retículo endoplásmico o el Golgi y para que esto ocurra, es importante el citoesqueleto de actina y tubulina (Hyde et al., 2009, 2012; Hyde & Mackenzie, 2010). Por tanto, es probable que miosina 1g participe durante ese proceso y la ausencia de esta proteína pueda afectar la formación de estos complejos replicativos y en consecuencia la replicación.

En conjunto estos datos sugieren que CD44 es una molécula de unión para MNV-1, aunque probablemente no la única, que MNV-1 interacciona con CD44 en el sitio de reconocimiento por el anticuerpo NIM-R8, y finalmente que Myo1g es una molécula clave en la movilización de CD44 al sitio de contacto de MNV-1 con célula blanco, participando así en el proceso de entrada de MVN-1 a los linfocitos.

#### **CONCLUSIONES:**

- CD300lf se expresa específicamente en linfocitos B de zona marginal del bazo en el ratón.
- La activación de linfocitos B con LPS + IL-4 aumenta la expresión de CD44, pero no de CD300lf en la membrana de los linfocitos B.

- La ausencia de myo1g afecta la unión y la infección por MNV-1 en linfocitos B.
- El bloqueo de CD44 con anticuerpos específicos genera una reducción significativa de la proteína NS7 en linfocitos B infectados.
- CD44 participa en la unión del MNV-1 en los linfocitos B.

#### **PROSPECTIVAS:**

- Evaluar la infección de MNV-1 en distintas poblaciones de linfocitos B de bazo y placas de Peyer.
- Corroborar la participación de CD300lf y CD44 como receptores para MNV-1 en linfocitos B.
- Evaluar la participación de Myo1g durante la endocitosis de MNV-1
- Evaluar la participación de Myo1g en la formación de complejos replicativos de MNV-1.
- Corroborar la secreción de vesículas extracelulares durante la infección de MNV-1 en los linfocitos B
- Realizar ensayos para demostrar que VP1 interactúa directamente con CD44.
- Realizar ensayos de unión más robustos en células CD44 +/+ y CD44 -/- así como en células MYO1G +/+ y MYO1G -/-.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Alhatlani, B., Vashist, S., & Goodfellow, I. (2015). Functions of the 5' and 3' ends of calicivirus genomes. *Virus Research*, 206, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.002>
- Atmar, R. L., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Estes, M. K., Crawford, S. E., Neill, F. H., & Graham, D. Y. (2008). Norwalk Virus Shedding after Experimental Human Infection. *Emerging Infectious Diseases*, 14(10), 1553–1557. <https://doi.org/10.3201/eid1410.080117>
- Bartsch, S. M., Lopman, B. A., Ozawa, S., Hall, A. J., & Lee, B. Y. (2016). Global economic burden of norovirus gastroenteritis. *PLoS ONE*, 11(4), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151219>
- Basic, M., Keubler, L. M., Buettner, M., Achard, M., Breves, G., Schröder, B., Smoczek, A., Jörns, A., Wedekind, D., Zschemisch, N. H., Günther, C., Neumann, D., Lienenklaus, S., Weiss, S., Hornef, M. W., Mähler, M., & Bleich, A. (2014). Norovirus Triggered Microbiota-driven Mucosal Inflammation in Interleukin 10-deficient Mice. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(3), 431–443. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000441346.86827.ed>
- Berg, J. S., Powell, B. C., & Cheney, R. E. (2001). A Millennial Myosin Census. *Molecular Biology of the Cell*, 12(4), 780–794. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.4.780>
- Bhar, S., & Jones, M. K. (2019). In Vitro Replication of Human Norovirus. *Viruses*, 11(6), 547. <https://doi.org/10.3390/v11060547>
- Bidawid, S., Malik, N., Adegbunrin, O., Sattar, S. A., & Farber, J. M. (2003). A feline kidney cell line-based plaque assay for feline calicivirus, a surrogate for Norwalk virus. *Journal of Virological Methods*, 107(2), 163–167. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00214-8](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00214-8)
- Bok, K., Parra, G. I., Mitra, T., Abente, E., Shaver, C. K., Boon, D., Engle, R., Yu, C., Kapikian, A. Z., Sosnovtsev, S. V., Purcell, R. H., & Green, K. Y.

- (2011). Chimpanzees as an animal model for human norovirus infection and vaccine development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), 325–330. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014577107>
- Borg, C., Jahun, A. S., Thorne, L., Sorgeloos, F., Bailey, D., & Goodfellow, I. G. (2021). Murine norovirus virulence factor 1 (VF1) protein contributes to viral fitness during persistent infection. *Journal of General Virology*, 102(9). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001651>
- Borrego, F. (2013). The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system. *Blood*, 121(11), 1951–1960. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-435057>
- Bradley, R. K., & Anczuków, O. (2023). RNA splicing dysregulation and the hallmarks of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 23(3), 135–155. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00541-7>
- Bragazzi Cunha, J., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.06.001>
- Canales, R. A., Reynolds, K. A., Wilson, A. M., Fankem, S. L. M., Weir, M. H., Rose, J. B., Abd-Elmaksoud, S., & Gerba, C. P. (2019). Modeling the role of fomites in a norovirus outbreak. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 16(1), 16–26. <https://doi.org/10.1080/15459624.2018.1531131>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2023). *Norovirus Burden and Trends* | CDC. <https://www.cdc.gov/norovirus/burden.html>
- Chaffer, C. L., & Goetz, J. G. (2018). CD44 Orchestrates Metastatic Teamwork. *Developmental Cell*, 47(6), 691–693. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.11.038>

- Chang, K.-O., Sosnovtsev, S. S., Belliot, G., Wang, Q., Saif, L. J., & Green, K. Y. (2005). Reverse Genetics System for Porcine Enteric Calicivirus, a Prototype Sapovirus in the *Caliciviridae*. *Journal of Virology*, *79*(3), 1409–1416. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.3.1409-1416.2005>
- Chen, L., Fu, C., Zhang, Q., He, C., Zhang, F., & Wei, Q. (2020). The role of CD44 in pathological angiogenesis. *The FASEB Journal*, *34*(10), 13125–13139. <https://doi.org/10.1096/fj.202000380RR>
- Cheng, H.-Y., Hung, M.-N., Chen, W.-C., Lo, Y.-C., Su, Y.-S., Wei, H.-Y., Chen, M.-Y., Tuan, Y.-C., Lin, H.-C., Lin, H.-Y., Liu, T.-Y., Wang, Y.-Y., & Wu, F.-T. (2017). Ice-associated norovirus outbreak predominantly caused by GII.17 in Taiwan, 2015. *BMC Public Health*, *17*(1), 870. <https://doi.org/10.1186/s12889-017-4869-4>
- Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G. I., Chan, M. C.-W., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P. A., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M. P. G., & Vinjé, J. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of General Virology*, *100*(10), 1393–1406. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001318>
- Choi, S.-C., Simhadri, V. R., Tian, L., Gil-Krzewska, A., Krzewski, K., Borrego, F., & Coligan, J. E. (2011). Cutting Edge: Mouse CD300f (CMRF-35–Like Molecule-1) Recognizes Outer Membrane-Exposed Phosphatidylserine and Can Promote Phagocytosis. *The Journal of Immunology*, *187*(7), 3483–3487. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101549>
- Cotton, B. T., Hyde, J. L., Sarvestani, S. T., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y., White, P. A., & Mackenzie, J. M. (2017). The Norovirus NS3 Protein Is a Dynamic Lipid- and Microtubule-Associated Protein Involved in Viral RNA Replication. *Journal of Virology*, *91*(3). <https://doi.org/10.1128/JVI.02138-16>
- Cruz-Zárate, D., López-Ortega, O., Girón-Pérez, D. A., Gonzalez-Suarez, A. M., García-Cordero, J. L., Schnoor, M., & Santos-Argumedo, L. (2021).

- Myo1g is required for efficient adhesion and migration of activated B lymphocytes to inguinal lymph nodes. *Scientific Reports*, 11(1), 7197. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85477-y>
- Davies, C., & Ward, V. K. (2016). Expression of the NS5 (VPg) Protein of Murine Norovirus Induces a G1/S Phase Arrest. *PLOS ONE*, 11(8), e0161582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161582>
- de Graaf, M., van Beek, J., Vennema, H., Podkolzin, A. T., Hewitt, J., Bucardo, F., Templeton, K., Mans, J., Nordgren, J., Reuter, G., Lynch, M., Rasmussen, L. D., Iritani, N., Chan, M. C., Martella, V., Ambert-Balay, K., Vinjé, J., White, P. A., & Koopmans, M. P. (2015). Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? *Eurosurveillance*, 20(26). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.26.21178>
- Dolin, R., & Treanor, J. J. (2015). Noroviruses and sapoviruses (caliciviruses). In *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases* (pp. 2122–2127). Elsevier.
- Doultree, J. C., Druce, J. D., Birch, C. J., Bowden, D. S., & Marshall, J. A. (1999). Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *Journal of Hospital Infection*, 41(1), 51–57. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(99\)90037-3](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(99)90037-3)
- Duizer, E., Schwab, K. J., Neill, F. H., Atmar, R. L., Koopmans, M. P. G., & Estes, M. K. (2004). Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology*, 85(1), 79–87. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19478-0>
- Ettayebi, K., Crawford, S. E., Murakami, K., Broughman, J. R., Karandikar, U., Tenge, V. R., Neill, F. H., Blutt, S. E., Zeng, X.-L., Qu, L., Kou, B., Opekun, A. R., Burrin, D., Graham, D. Y., Ramani, S., Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2016). Replication of human noroviruses in stem cell–derived human enteroids. *Science*, 353(6306), 1387–1393. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5211>

- Ettayebi, K., & Hardy, M. E. (2003). Norwalk Virus Nonstructural Protein p48 Forms a Complex with the SNARE Regulator VAP-A and Prevents Cell Surface Expression of Vesicular Stomatitis Virus G Protein. *Journal of Virology*, 77(21), 11790–11797. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.21.11790-11797.2003>
- Fernandez-Vega, V., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., King, A. D., Mitra, T., Gorbalenya, A., & Green, K. Y. (2004). Norwalk Virus N-Terminal Nonstructural Protein Is Associated with Disassembly of the Golgi Complex in Transfected Cells. *Journal of Virology*, 78(9), 4827–4837. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.9.4827-4837.2004>
- Flynn, W. T., Saif, L. J., & Moorhead, P. D. (1988). Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day-old gnotobiotic pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 49(6), 819–825.
- Fox, S. B., Fawcett, J., Jackson, D. G., Collins, I., Gatter, K. C., Harris, A. L., Gearing, A., & Simmons, D. L. (1994). Normal Human Tissues, in Addition to Some Tumors, Express Multiple Different CD44 Isoforms. *Cancer Research*, 54(16), 4539–4546.
- Gérard, A., Patino-Lopez, G., Beemiller, P., Nambiar, R., Ben-Aissa, K., Liu, Y., Totah, F. J., Tyska, M. J., Shaw, S., & Krummel, M. F. (2014). Detection of Rare Antigen-Presenting Cells through T Cell-Intrinsic Meandering Motility, Mediated by Myo1g. *Cell*, 158(3), 492–505. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.044>
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D. J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., Bruschi, M., Harcus, Y., Zimmermann, V. S., Taylor, N., Maizels, R. M., & Jay, P. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*, 529(7585), 226–230. <https://doi.org/10.1038/nature16527>
- Girón-Pérez, D. A., Piedra-Quintero, Z. L., & Santos-Argumedo, L. (2019). Class I myosins: Highly versatile proteins with specific functions in the

immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, 105(5), 973–981.  
<https://doi.org/10.1002/JLB.1MR0918-350RRR>

Gonzalez-Hernandez, M. B., Liu, T., Payne, H. C., Stencel-Baerenwald, J. E., Ikizler, M., Yagita, H., Dermody, T. S., Williams, I. R., & Wobus, C. E. (2014). Efficient Norovirus and Reovirus Replication in the Mouse Intestine Requires Microfold (M) Cells. *Journal of Virology*, 88(12), 6934–6943.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.00204-14>

Grau, K. R., Roth, A. N., Zhu, S., Hernandez, A., Colliou, N., DiVita, B. B., Philip, D. T., Riffe, C., Giasson, B., Wallet, S. M., Mohamadzadeh, M., & Karst, S. M. (2017). The major targets of acute norovirus infection are immune cells in the gut-associated lymphoid tissue. *Nature Microbiology*, 2(12), 1586–1591. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0057-7>

Graziano, V. R., Walker, F. C., Kennedy, E. A., Wei, J., Ettayebi, K., Strine, M. S., Filler, R. B., Hassan, E., Hsieh, L. L., Kim, A. S., Kolawole, A. O., Wobus, C. E., Lindesmith, L. C., Baric, R. S., Estes, M. K., Orchard, R. C., Baldrige, M. T., & Wilen, C. B. (2020). CD300lf is the primary physiologic receptor of murine norovirus but not human norovirus. *PLOS Pathogens*, 16(4), e1008242. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008242>

Green, K. (2006). Caliciviridae: the noroviruses. *Fields Virology*, 949–975.

Guix, S., Asanaka, M., Katayama, K., Crawford, S. E., Neill, F. H., Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2007). Norwalk Virus RNA Is Infectious in Mammalian Cells. *Journal of Virology*, 81(22), 12238–12248.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.01489-07>

Gutjahr, J. C., Greil, R., & Hartmann, T. N. (2015). The Role of CD44 in the Pathophysiology of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00177>

Haga, K., Fujimoto, A., Takai-Todaka, R., Miki, M., Doan, Y. H., Murakami, K., Yokoyama, M., Murata, K., Nakanishi, A., & 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*, 113(41).  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1605575113>

Hammer, J. A., & Sellers, J. R. (2012). Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(1), 13–26. <https://doi.org/10.1038/nrm3248>

Han, K. R., Lee, J.-H., Kotiguda, G. G., Jung, K. H., Chung, M. S., Kang, S., Hwang, S., & Kim, K. H. (2018). Nucleotide triphosphatase and RNA chaperone activities of murine norovirus NS3. *Journal of General Virology*, 99(11), 1482–1493. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001151>

Hardy, M. E. (2005). Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.031>

Hathcock, K. S., Hirano, H., Murakami, S., & Hodes, R. J. (1993). CD44 expression on activated B cells. Differential capacity for CD44-dependent binding to hyaluronic acid. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 151(12), 6712–6722.

Herbst-Kralovetz, M. M., Radtke, A. L., Lay, M. K., Hjelm, B. E., Bolick, A. N., Sarker, S. S., Atmar, R. L., Kingsley, D. H., Arntzen, C. J., Estes, M. K., & Nickerson, C. A. (2013). Lack of Norovirus Replication and Histo-Blood Group Antigen Expression in 3-Dimensional Intestinal Epithelial Cells. *Emerging Infectious Diseases*, 19(3), 431–438.  
<https://doi.org/10.3201/eid1903.121029>

Hyde, J. L., Gillespie, L. K., & Mackenzie, J. M. (2012). Mouse Norovirus 1 Utilizes the Cytoskeleton Network To Establish Localization of the Replication Complex Proximal to the Microtubule Organizing Center. *Journal of Virology*, 86(8), 4110–4122. <https://doi.org/10.1128/JVI.05784-11>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.06.047>
- Hyde, J. L., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y., Wobus, C., Virgin, H. W., & Mackenzie, J. M. (2009). Mouse Norovirus Replication Is Associated with Virus-Induced Vesicle Clusters Originating from Membranes Derived from the Secretory Pathway. *Journal of Virology*, *83*(19), 9709–9719. <https://doi.org/10.1128/JVI.00600-09>
- Jalkanen, S. T., Bargatze, R. F., Herron, L. R., & Butcher, E. C. (1986). A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *European Journal of Immunology*, *16*(10), 1195–1202. <https://doi.org/10.1002/eji.1830161003>
- Jiang, X., Wang, M., Wang, K., & Estes, M. K. (1993). Sequence and Genomic Organization of Norwalk Virus. *Virology*, *195*(1), 51–61. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1345>
- Jones, M. K., Grau, K. R., Costantini, V., Kolawole, A. O., de Graaf, M., Freiden, P., Graves, C. L., Koopmans, M., Wallet, S. M., Tibbetts, S. A., Schultz-Cherry, S., Wobus, C. E., Vinjé, J., & Karst, S. M. (2015). Human norovirus culture in B cells. *Nature Protocols*, *10*(12), 1939–1947. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.121>
- Jones, M. K., Watanabe, M., Zhu, S., Graves, C. L., Keyes, L. R., Grau, K. R., Gonzalez-Hernandez, M. B., Iovine, N. M., Wobus, C. E., Vinjé, J., Tibbetts, S. A., Wallet, S. M., & Karst, S. M. (2014). Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science*, *346*(6210), 755–759. <https://doi.org/10.1126/science.1257147>
- Karandikar, U. C., Crawford, S. E., Ajami, N. J., Murakami, K., Kou, B., Ettayebi, K., Papanicolaou, G. A., Jongwutiwes, U., Perales, M.-A., Shia, J., Mercer, D., Finegold, M. J., Vinjé, J., Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2016).

- Detection of human norovirus in intestinal biopsies from immunocompromised transplant patients. *Journal of General Virology*, 97(9), 2291–2300. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000545>
- Karst, S. M. (2015). Identification of a novel cellular target and a co-factor for norovirus infection – B cells & commensal bacteria. *Gut Microbes*, 6(4), 266–271. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1052211>
- Karst, S. M., & Wobus, C. E. (2015). A Working Model of How Noroviruses Infect the Intestine. *PLOS Pathogens*, 11(2), e1004626. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004626>
- KATAYAMA, K. (2017). Discovery of murine norovirus receptor. *Uirusu*, 67(2), 111–120. <https://doi.org/10.2222/jsv.67.111>
- Kolawole, A. O., Gonzalez-Hernandez, M. B., Turula, H., Yu, C., Elftman, M. D., & Wobus, C. E. (2016). Oral Norovirus Infection Is Blocked in Mice Lacking Peyer's Patches and Mature M Cells. *Journal of Virology*, 90(3), 1499–1506. <https://doi.org/10.1128/JVI.02872-15>
- Kremmidiotis, G., & Zola, H. (1995). Changes in CD44 Expression during B Cell Differentiation in the Human Tonsil. *Cellular Immunology*, 161(2), 147–157. <https://doi.org/10.1006/cimm.1995.1021>
- Krendel, M., & Mooseker, M. S. (2005). Myosins: Tails (and Heads) of Myosin Superfamily: Diversity of. *Physiology*, 20(20), 239–251.
- Kwan, H. S., Chan, P. K. S., & Chan, M. C. W. (2017). Overview of Norovirus as a Foodborne Pathogen. In *The Norovirus* (pp. 21–30). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804177-2.00002-6>
- Lauring, A. S., Frydman, J., & Andino, R. (2013). The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 11(5), 327–336. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3003>
- Lay, M. K., Atmar, R. L., Guix, S., Bharadwaj, U., He, H., Neill, F. H., Sastry, K. J., Yao, Q., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.001>
- Lee, J.-H., Alam, I., Han, K. R., Cho, S., Shin, S., Kang, S., Yang, J. M., & Kim, K. H. (2011). Crystal structures of murine norovirus-1 RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology*, 92(7), 1607–1616. <https://doi.org/10.1099/vir.0.031104-0>
- Lee, J.-H., Park, B. S., Alam, I., Han, K. R., Biering, S. B., Kim, S. J., Choi, J., Seok, J. H., Chung, M. S., Kim, H. M., Hwang, S., & Kim, K. H. (2018). Insight Into the Interaction Between RNA Polymerase and VPg for Murine Norovirus Replication. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01466>
- Lesley, J., Hyman, R., & Kincade, P. W. (1993). *CD44 and Its Interaction with Extracellular Matrix* (pp. 271–335). [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60537-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60537-4)
- Li, T.-F., Hosmillo, M., Schwanke, H., Shu, T., Wang, Z., Yin, L., Curry, S., Goodfellow, I. G., & Zhou, X. (2018). Human Norovirus NS3 Has RNA Helicase and Chaperoning Activities. *Journal of Virology*, 92(5). <https://doi.org/10.1128/JVI.01606-17>
- LOH, T. J., MOON, H., CHO, S., JANG, H., LIU, Y. C., TAI, H., JUNG, D.-W., WILLIAMS, D. R., KIM, H.-R., SHIN, M.-G., LIAO, D. J., ZHOU, J., SHI, W., ZHENG, X., & SHEN, H. (2015). CD44 alternative splicing and hnRNP A1 expression are associated with the metastasis of breast cancer. *Oncology Reports*, 34(3), 1231–1238. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4110>
- López-Ortega, O., & Santos-Argumedo, L. (2017). Myosin 1g Contributes to CD44 Adhesion Protein and Lipid Rafts Recycling and Controls CD44 Capping and Cell Migration in B Lymphocytes. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01731>

- Lu, J., Fang, L., Zheng, H., Lao, J., Yang, F., Sun, L., Xiao, J., Lin, J., Song, T., Ni, T., Raghvani, J., Ke, C., Faria, N. R., Bowden, T. A., Pybus, O. G., & Li, H. (2016). The Evolution and Transmission of Epidemic GII.17 Noroviruses. *Journal of Infectious Diseases*, 214(4), 556–564. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw208>
- Maltseva, D., & Tonevitsky, A. (2023). RNA-binding proteins regulating the CD44 alternative splicing. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1326148>
- Maravillas-Montero, J. L., López-Ortega, O., Patiño-López, G., & Santos-Argumedo, L. (2014). Myosin 1g regulates cytoskeleton plasticity, cell migration, exocytosis, and endocytosis in B lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 44(3), 877–886. <https://doi.org/10.1002/eji.201343873>
- Maravillas-Montero, J. L., & Santos-Argumedo, L. (2011). The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 91(1), 35–46. <https://doi.org/10.1189/jlb.0711335>
- MARSH, Z. A., GRYTAL, S. P., BEGGS, J. C., LESHEM, E., GASTAÑADUY, P. A., RHA, B., NYAKU, M., LOPMAN, B. A., & HALL, A. J. (2018). The unwelcome houseguest: secondary household transmission of norovirus. *Epidemiology and Infection*, 146(2), 159–167. <https://doi.org/10.1017/S0950268817002783>
- Maunula, L., Miettinen, I. T., & von Bonsdorff, C.-H. (2005). Norovirus Outbreaks from Drinking Water. *Emerging Infectious Diseases*, 11(11), 1716–1721. <https://doi.org/10.3201/eid1111.050487>
- May, J., Korba, B., Medvedev, A., & Viswanathan, P. (2013). Enzyme kinetics of the human norovirus protease control virus polyprotein processing order. *Virology*, 444(1–2), 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.013>

- McFadden, N., Bailey, D., Carrara, G., Benson, A., Chaudhry, Y., Shortland, A., Heeney, J., Yarovinsky, F., Simmonds, P., Macdonald, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002413>
- McIntosh, B. B., & Ostap, E. M. (2016). Myosin-I molecular motors at a glance. *Journal of Cell Science*, 129(14), 2689–2695. <https://doi.org/10.1242/jcs.186403>
- McSweeney, A., Davies, C., & Ward, V. (2019). Cell Cycle Arrest is a Conserved Function of Norovirus VPg Proteins. *Viruses*, 11(3), 217. <https://doi.org/10.3390/v11030217>
- Meyers, G., Wirblich, C., Thiel, H.-J., & Thumfart, J. O. (2000). Rabbit Hemorrhagic Disease Virus: Genome Organization and Polyprotein Processing of a Calicivirus Studied after Transient Expression of cDNA Constructs. *Virology*, 276(2), 349–363. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0545>
- Miguel Rodríguez, C. E. (2018). *Evaluación de la infección de norovirus murino tipo 1 en linfocitos B esplénicos de ratón*. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/1079>
- Mouchtouri, V. A., Verykoui, E., Zamfir, D., Hadjipetris, C., Lewis, H. C., & Hadjichristodoulou, C. (2017). Gastroenteritis outbreaks on cruise ships: contributing factors and thresholds for early outbreak detection. *Eurosurveillance*, 22(45). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.45.16-00576>
- Mumphrey, S. M., Changotra, H., Moore, T. N., Heimann-Nichols, E. R., Wobus, C. E., Reilly, M. J., Moghadamfalahi, M., Shukla, D., & Karst, S. M. (2007). Murine Norovirus 1 Infection Is Associated with Histopathological Changes in Immunocompetent Hosts, but Clinical

Disease Is Prevented by STAT1-Dependent Interferon Responses. *Journal of Virology*, 81(7), 3251–3263. <https://doi.org/10.1128/JVI.02096-06>

Nelson, C. A., Wilen, C. B., Dai, Y.-N., Orchard, R. C., Kim, A. S., Stegeman, R. A., Hsieh, L. L., Smith, T. J., Virgin, H. W., & Fremont, D. H. (2018). Structural basis for murine norovirus engagement of bile acids and the CD300lf receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(39). <https://doi.org/10.1073/pnas.1805797115>

Nice, T. J., Strong, D. W., McCune, B. T., Pohl, C. S., & Virgin, H. W. (2013). A Single-Amino-Acid Change in Murine Norovirus NS1/2 Is Sufficient for Colonic Tropism and Persistence. *Journal of Virology*, 87(1), 327–334. <https://doi.org/10.1128/JVI.01864-12>

Obaid, R. J., Shafie, A., Malik, M. S., Al-Rooqi, M. M., Moussa, Z., Abdulaziz, O., Aljuaid, A., Allahyani, M., Almehmadi, M., Anjum, F., & Ahmed, S. A. (2023). In Silico Screening and Molecular Dynamics Simulation Studies in the Identification of Natural Compound Inhibitors Targeting the Human Norovirus RdRp Protein to Fight Gastroenteritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 5003. <https://doi.org/10.3390/ijms24055003>

Odrionitz, F., & Kollmar, M. (2007). Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biology*, 8(9), R196. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-r196>

Olety, B., Wälte, M., Honnert, U., Schillers, H., & Bähler, M. (2010). Myosin 1G (Myo1G) is a haematopoietic specific myosin that localises to the plasma membrane and regulates cell elasticity. *FEBS Letters*, 584(3), 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.096>

Patel, M. M., Widdowson, M.-A., Glass, R. I., Akazawa, K., Vinjé, J., & Parashar, U. D. (2008). Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1224–1231. <https://doi.org/10.3201/eid1408.071114>

- Patino-Lopez, G., Aravind, L., Dong, X., Kruhlak, M. J., Ostap, E. M., & Shaw, S. (2010). Myosin 1G Is an Abundant Class I Myosin in Lymphocytes Whose Localization at the Plasma Membrane Depends on Its Ancient Divergent Pleckstrin Homology (PH) Domain (Myo1PH). *Journal of Biological Chemistry*, 285(12), 8675–8686. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.086959>
- Prasad, B. V, Rothnagel, R., Jiang, X., & Estes, M. K. (1994a). Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *Journal of Virology*, 68(8), 5117–5125. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.8.5117-5125.1994>
- Prasad, B. V, Rothnagel, R., Jiang, X., & Estes, M. K. (1994b). Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *Journal of Virology*, 68(8), 5117–5125. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.8.5117-5125.1994>
- Qiagen, F. S. (2003). *The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins Fifth Edition QIAGEN Distributors QIAGEN Companies QIAGEN Worldwide Orders 800-572-9613 • Fax 800-713-5951 • Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737). www.qiagen.co.jpwww.qiagen.com*
- Rasko, D. A., Wang, G., Monteiro, M. A., Palcic, M. M., & Diane E. Taylor. (2000). Synthesis of mono- and di-fucosylated type I Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori*. *European Journal of Biochemistry*, 267(19), 6059–6066. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01683.x>
- Robilotti, E., Deresinski, S., & Pinsky, B. A. (2015). Norovirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 134–164. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-14>
- SANTOS-ARGUMEDO, L., KINCADE, P. W., PARTIDA-SÁNCHEZ, S., & PARKHOUSE, R. M. E. (1997). CD44-stimulated dendrite formation

- ('spreading') in activated B cells. *Immunology*, 90(1), 147–153. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1997.00126.x>
- Santos-Argumedo, L., Maravillas-Montero, J. L., & López-Ortega, O. (2013). Class I myosins in B-cell physiology: functions in spreading, immune synapses, motility, and vesicular traffic. *Immunological Reviews*, 256(1), 190–202. <https://doi.org/10.1111/imr.12105>
- Schneider, W. L., & Roossinck, M. J. (2001). Genetic Diversity in RNA Virus Quasispecies Is Controlled by Host-Virus Interactions. *Journal of Virology*, 75(14), 6566–6571. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6566-6571.2001>
- Sellers, J. R. (2000). Myosins: A diverse superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1496(1), 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(00\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(00)00005-7)
- Senbanjo, L. T., & Chellaiah, M. A. (2017). CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00018>
- Shimoike, T., Hayashi, T., Oka, T., & Muramatsu, M. (2021). The predicted stem-loop structure in the 3'-end of the human norovirus antigenomic sequence is required for its genomic RNA synthesis by its RdRp. *Journal of Biological Chemistry*, 297(4), 101225. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101225>
- Siebenga, J. J., Vennema, H., Zheng, D., Vinjé, J., Lee, B. E., Pang, X., Ho, E. C. M., Lim, W., Choudekar, A., Broor, S., Halperin, T., Rasool, N. B. G., Hewitt, J., Greening, G. E., Jin, M., Duan, Z., Lucero, Y., O’Ryan, M., Hoehne, M., ... Koopmans, M. (2009). Norovirus Illness Is a Global Problem: Emergence and Spread of Norovirus GII.4 Variants, 2001–2007. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(5), 802–812. <https://doi.org/10.1086/605127>

- Singh, B. K., Leuthold, M. M., & Hansman, G. S. (2016). Structural Constraints on Human Norovirus Binding to Histo-Blood Group Antigens. *MSphere*, 1(2). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00049-16>
- SLOMKA, M. J., & APPLETON, H. (1998). Feline calicivirus as a model system for heat inactivation studies of small round structured viruses in shellfish. *Epidemiology and Infection*, 121(2), 401–407. <https://doi.org/10.1017/S0950268898001290>
- Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Chang, K.-O., Prikhodko, V. G., Thackray, L. B., Wobus, C. E., Karst, S. M., Virgin, H. W., & Green, K. Y. (2006). Cleavage Map and Proteolytic Processing of the Murine Norovirus Nonstructural Polyprotein in Infected Cells. *Journal of Virology*, 80(16), 7816–7831. <https://doi.org/10.1128/JVI.00532-06>
- Sosnovtsev, S. V., Garfield, M., & Green, K. Y. (2002). Processing Map and Essential Cleavage Sites of the Nonstructural Polyprotein Encoded by ORF1 of the Feline Calicivirus Genome. *Journal of Virology*, 76(14), 7060–7072. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.14.7060-7072.2002>
- Spence, J. R. (2018). Taming the Wild West of Organoids, Enteroids, and Mini-Guts. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 5(2), 159–160. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.11.003>
- Springer, G. F., Williamson, P., & Brandes, W. C. (1961). BLOOD GROUP ACTIVITY OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA. *The Journal of Experimental Medicine*, 113(6), 1077–1093. <https://doi.org/10.1084/jem.113.6.1077>
- Squire, J. M. (2016). Muscle contraction: Sliding filament history, sarcomere dynamics and the two Huxleys. *Global Cardiology Science and Practice*, 2016(2). <https://doi.org/10.21542/gcsp.2016.11>
- Takanashi, S., Saif, L. J., Hughes, J. H., Meulia, T., Jung, K., Scheuer, K. A., & Wang, Q. (2014). Failure of propagation of human norovirus in intestinal

- epithelial cells with microvilli grown in three-dimensional cultures. *Archives of Virology*, 159(2), 257–266. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1806-4>
- Taube, S., Kolawole, A. O., Höhne, M., Wilkinson, J. E., Handley, S. A., Perry, J. W., Thackray, L. B., Akkina, R., & Wobus, C. E. (2013). A Mouse Model for Human Norovirus. *MBio*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00450-13>
- Taube, S., Perry, J. W., Yetming, K., Patel, S. P., Auble, H., Shu, L., Nawar, H. F., Lee, C. H., Connell, T. D., Shayman, J. A., & Wobus, C. E. (2009). Ganglioside-Linked Terminal Sialic Acid Moieties on Murine Macrophages Function as Attachment Receptors for Murine Noroviruses. *Journal of Virology*, 83(9), 4092–4101. <https://doi.org/10.1128/JVI.02245-08>
- Teunis, P. F. M., Moe, C. L., Liu, P., E. Miller, S., Lindesmith, L., Baric, R. S., Le Pendu, J., & Calderon, R. L. (2008). Norwalk virus: How infectious is it? *Journal of Medical Virology*, 80(8), 1468–1476. <https://doi.org/10.1002/jmv.21237>
- Thackray, L. B., Wobus, C. E., Chachu, K. A., Liu, B., Alegre, E. R., Henderson, K. S., Kelley, S. T., & Virgin, H. W. (2007). Murine Noroviruses Comprising a Single Genogroup Exhibit Biological Diversity despite Limited Sequence Divergence. *Journal of Virology*, 81(19), 10460–10473. <https://doi.org/10.1128/JVI.00783-07>
- Titus, M. A. (2018). Myosin-Driven Intracellular Transport. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(3), a021972. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021972>
- von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.-E., & Locksley, R. M. (2016). Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. *Nature*, 529(7585), 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature16161>
- Wang, G., Zhang, D., Orchard, R. C., Hancks, D. C., & Reese, T. A. (2023). Norovirus MLKL-like protein initiates cell death to induce viral egress. *Nature*, 616(7955), 152–158. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05851-w>

- WHO, W. H. O. (2019). *23 million people falling ill from unsafe food each year in Europe is just the tip of the iceberg*. <https://www.who.int/news/item/05-06-2019-23-million-people-falling-ill-from-unsafe-food-each-year-in-europe-is-just-the-tip-of-the-iceberg>
- Wilén, C. B., Lee, S., Hsieh, L. L., Orchard, R. C., Desai, C., Hykes, B. L., McAllaster, M. R., Balce, D. R., Feehley, T., Brestoff, J. R., Hickey, C. A., Yokoyama, C. C., Wang, Y.-T., MacDuff, D. A., Kreamalmayer, D., Howitt, M. R., Neil, J. A., Cadwell, K., Allen, P. M., ... Virgin, H. W. (2018). Tropism for tuft cells determines immune promotion of norovirus pathogenesis. *Science*, *360*(6385), 204–208. <https://doi.org/10.1126/science.aar3799>
- Wobus, C. E., Karst, S. M., Thackray, L. B., Chang, K.-O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J. M., Green, K. Y., & Virgin, H. W. (2004). Replication of Norovirus in Cell Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophages. *PLoS Biology*, *2*(12), e432. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020432>
- 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. <https://doi.org/10.1128/jvi.02346-05>
- Yi, W., Shao, J., Zhu, L., Li, M., Singh, M., Lu, Y., Lin, S., Li, H., Ryu, K., Shen, J., Guo, H., Yao, Q., Bush, C. A., & Wang, P. G. (2005). *Escherichia coli* O86 O-Antigen Biosynthetic Gene Cluster and Stepwise Enzymatic Synthesis of Human Blood Group B Antigen Tetrasaccharide. *Journal of the American Chemical Society*, *127*(7), 2040–2041. <https://doi.org/10.1021/ja045021y>
- Yu, B., Wang, L., & Chu, Y. (2021). Gut microbiota shape B cell in health and disease settings. *Journal of Leukocyte Biology*, *110*(2), 271–281. <https://doi.org/10.1002/JLB.1MR0321-660R>
- Zhu, S., Regev, D., Watanabe, M., Hickman, D., Moussatche, N., Jesus, D. M., Kahan, S. M., Naphine, S., Brierley, I., Hunter, R. N., Devabhaktuni, D.,

Jones, M. K., & Karst, S. M. (2013). Identification of Immune and Viral Correlates of Norovirus Protective Immunity through Comparative Study of Intra-Cluster Norovirus Strains. *PLoS Pathogens*, 9(9), e1003592. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003592>

Zöller, M. (2011). CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nature Reviews Cancer*, 11(4), 254–267. <https://doi.org/10.1038/nrc3023>

## ANEXOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

ALUMNO: (A): Carlos Emilio Miguel Rodríguez

MAESTRIA

DOCTORADO

TITULO DE LA TESIS: Participación de CD44 en el proceso de unión del norovirus murino-1 (MNV-1) en linfocitos B de ratón.

NO SE SUGIEREN MODIFICACIONES

SE SUGIEREN MODIFICACIONES

No es necesario que el alumno (a) regrese la tesis para la revisión de las modificaciones.

Se requiere que el alumno (a) regrese la tesis para la revisión de las modificaciones.

NO SE APRUEBA EL MANUSCRITO DE TESIS

NOMBRE DEL REVISOR: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

FIRMA: \_\_\_\_\_

FECHA: 10 de junio de 2024