



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE ROTAVIRUS CON VESÍCULAS
EXTRACELULARES EN CÉLULAS MA104**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
ARIANNA PÉREZ DELGADO**

PAVEL ISA
[Instituto de Biotecnología](#)

Dra. LEONOR PÉREZ MARTÍNEZ
[Instituto de Biotecnología](#)

Dra. SOFIA LIZETH ALCARAZ ESTRADA
[Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado](#)

Cuernavaca, Mor., Julio, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1 Generalidades de los rotavirus.....	6
2.2 Ciclo de replicación de rotavirus	8
2.3 Vesículas extracelulares	12
2.4 Vesículas extracelulares y virus	17
3. ANTECEDENTES	20
3.1 Vesículas extracelulares y rotavirus.....	20
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVO GENERAL	22
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1 Células y virus	23
7.2 Anticuerpos y reactivos.....	23
7.3 Viabilidad celular.....	24
7.4 Titulación viral por ensayo de formación de focos.....	24
7.5 Inmunodetección de proteínas	24
7.6 Cinética de salida viral	25
7.7 Ensayo de protección del virus a tripsina	25
7.8 Purificación de VEs.....	25
7.9 Análisis de trayectoria de nanopartículas.....	26
7.10 Tratamientos químicos de inhibición y estimulación de exosomas.....	26
7.11 Inmunofluorescencia.....	27
7.12 Determinación de la infectividad viral mediada por vesículas.....	27
7.13 Microscopía electrónica de transmisión	28
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
8.1 La cepa RRV de rotavirus se libera de células MA104 antes de la lisis celular	29
8.2 Presencia de virus extracelular protegido al tratamiento con tripsina	31
8.3 El virus extracelular se asocia mayormente a estructuras membranosas que sedimentan a altas velocidades de centrifugación	34
8.4 Determinación de marcadores que caracterizan la población de vesículas enriquecidas en la F3.....	38
8.5 La infección viral aumenta la liberación de vesículas en células MA104	42
8.6 Tratamientos químicos de inhibición y estimulación de la secreción de exosomas, ejercen efecto sobre la asociación de partículas virales con VEs	46
8.7 Análisis por MET muestra la asociación del virus a VEs	53

8.8 Análisis de inmunofluorescencias muestran colocalización de proteínas virales con marcadores de exosomas dentro de las células infectadas	57
8.9 La asociación de rotavirus a VEs no protege partículas virales de la acción de anticuerpos neutralizantes	60
9. CONCLUSIONES.....	64
10. PERSPECTIVAS.....	65
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de la TLP de rotavirus.....	8
Figura 2 Ciclo replicativo de rotavirus	11
Figura 3 Cinética de salida viral desde tiempos tempranos de la infección, previo a la lisis celular	29
Figura 4 Ensayo de protección a tripsina de virus extracelular a diferentes tiempos post-infección	32
Figura 5 Ensayo de protección para cada fracción de VEs purificada.....	35
Figura 6 La proteína VP4 del virus, no es totalmente procesada por tripsina en la F3.....	37
Figura 7 Caracterización de la población de vesículas enriquecidas en la F3, liberadas de células MA104 infectadas	39
Figura 8 Determinación de marcadores de exosomas, en VEs liberadas de células MA104 infectadas (C.i.) y no infectadas (C.n.i.).....	42
Figura 9 Determinación de la concentración de vesículas en el sobrenadante de células infectadas y no infectadas.....	44
Figura 10 Los tratamientos químicos de inhibición o estimulación de la biogénesis de exosomas en células MA104, se asocian a la liberación de menor o mayor cantidad de proteínas totales respectivamente	47
Figura 11 Los tratamientos químicos no afectan la integridad celular de células MA104.....	48
Figura 12 Los tratamientos químicos que estimulan e inhiben la secreción de exosomas, se relacionan con la mayor o menor presencia de virus protegido a tripsina en el sobrenadante de células MA104 infectadas.....	49
Figura 13 Los tratamientos con NH ₄ Cl de células MA104 infectadas con RRV aumentan la cantidad de proteínas virales y marcadores de exosomas, en el sobrenadante purificado ...	52
Figura 14 Microscopía electrónica de VEs de las tres fracciones purificadas	54
Figura 15 Colocalización de proteínas exosomales con proteínas virales en células MA104 infectadas.....	58
Figura 16 El virus en el medio celular asociado a VEs es neutralizado en las tres fracciones purificadas.....	60

1. RESUMEN

La infección por rotavirus es la principal causa de enfermedades diarreicas agudas en lactantes y niños menores de cinco años, representando un serio problema de salud a nivel mundial. Los rotavirus son virus no envueltos de simetría icosaédrica, con 100 nm de diámetro y un genoma de ARN de doble cadena. Los virus como patógenos intracelulares estrictos, utilizan múltiples vías celulares durante su ciclo replicativo, particularmente la de tráfico vesicular es utilizada para su entrada y/o eventual liberación, y algunas de estas vías convergen con la biogénesis de vesículas extracelulares (VEs). Las VEs se definen como estructuras esféricas limitadas por una bicapa lipídica, cuyo contenido depende de su origen y del estado de la célula donde se producen. Las VEs se pueden clasificar principalmente en: microvesículas y exosomas, según sus mecanismos de biogénesis. Los virus cuando infectan la célula, pueden modular la producción y el contenido de las VEs, incorporando en estas ARNs virales, proteínas e incluso viriones enteros, lo que puede facilitar su propagación, afectar el reconocimiento inmune del virus o modular a las células vecinas no infectadas, sensibilizándolas a la infección. Tradicionalmente se había pensado que rotavirus se liberaba de las células infectadas por lisis celular, aunque recientes estudios han demostrado que puede salir previo a la lisis, apuntando a una ruta de salida alternativa, donde el virus extracelular puede estar asociado a estructuras membranosas que flotan en un gradiente de densidad. Por otro lado se ha visto una importante función inmunomoduladora de las VEs liberadas de células infectadas con rotavirus. El objetivo del presente estudio es caracterizar la asociación de rotavirus con VEs, en la línea celular MA104. Inicialmente se determinó la presencia de virus protegidos a tripsina por estructuras membranosas, en tiempos tempranos de la infección donde no se detecta lisis celular, mostrando presencia de virus en el medio de células infectadas desde las 6 horas post-infección (hpi), y la mayor cantidad de virus asociado a membranas a las 10 hpi, donde permanece la integridad celular. La purificación de VEs mostró que la fracción donde se enriquecieron vesículas pequeñas (< 200 nm) es donde está la mayor cantidad de virus protegido por membranas, sugiriendo su asociación a estas vesículas purificadas, con tamaños entre 50 – 200 nm y presencia de marcadores reportados para exosomas (CD63, Hsp70 y Alix). Se compararon células infectadas y no infectadas en cuanto a la liberación de VEs y los

resultados sugieren que la infección de las células desencadena la liberación de vesículas, mayormente las pequeñas, cuya función aún se desconoce en este estudio, pero en otras investigaciones, VEs liberadas de células Caco-2 infectadas con rotavirus, se ha reportado con capacidad de inmunomodular células T. Por otra parte, el uso de tratamientos químicos que estimulan la secreción de exosomas (bafilomicina A1 y cloruro de amonio), a su vez aumentaron la liberación de virus asociado a vesículas en el medio extracelular. Además la colocalización en el citoplasma de células infectadas, entre CD63, Hsp70 y Alix y proteínas virales sugiere que una parte del virus que se libera pudiera hacerlo asociado a vesículas. La MET de las VEs liberadas de células infectadas, muestran la asociación de virus a vesículas, tanto grandes como pequeñas, pero mayormente con las pequeñas, asociándose a la membrana externa de las vesículas o contenidos dentro de estas. Por último quisimos determinar si esta asociación permitía al virus evadir anticuerpos neutralizantes e infectar las células. No observamos la protección de partículas virales de la acción de anticuerpos neutralizantes, por lo que al parecer las vesículas no favorecen un mecanismo de evasión de la respuesta inmune como se ha visto en otros virus, como el virus de hepatitis A y poliomavirus JC. Los datos que obtuvimos en este trabajo muestran un aumento de la liberación de vesículas extracelulares en células infectadas y la asociación de rotavirus a dichas vesículas en el medio celular a tiempos tempranos de la infección, previo a la lisis celular, donde una parte del virus que se libera pudiera hacerlo asociado a vesículas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades de los rotavirus

Los rotavirus son una de las principales causas de gastroenteritis con deshidratación severa en niños menores de cinco años en todo el mundo, lo que resulta en alrededor de 215 000 muertes al año (Tate *et al.*, 2016). Las vacunas de rotavirus atenuados se introdujeron en 2006 y han reducido significativamente el número de casos graves de la enfermedad. Sin embargo, estas vacunas son menos efectivas en los países en desarrollo donde la incidencia de esta enfermedad es mayor (Jonesteller *et al.*, 2017).

Los rotavirus son muy estables en el ambiente, lo cual facilita su transmisión por vía fecal – oral a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados, permitiendo la presencia del virus hasta el intestino delgado, donde infecta enterocitos diferenciados maduros cerca de las puntas de las vellosidades intestinales. El cuadro clínico de la enfermedad, implica vómitos y diarreas acuosas durante tres a ocho días, frecuentemente acompañada por fiebre y dolor abdominal. Las deshidrataciones severas y el desbalance electrolítico son las principales causas de amenaza para la vida de los infantes (Estes y Greenberg, 2013).

Se conoce que el virus desde el tracto gastrointestinal puede migrar hacia otros tejidos. Durante muchos años el impacto de la patología causada por rotavirus en niños ha sido subvalorado, con una clínica limitada solo al tracto gastrointestinal, especialmente en ausencia de diarrea, ya que la detección de antígeno rotaviral no constituye una prueba diagnóstica de rutina. Sin embargo, existe evidencia reciente de las implicaciones sistémicas de la infección, por lo que se describe que rotavirus puede producir una enfermedad sistémica con implicaciones clínicas y fisiopatológicas lejos del tracto gastrointestinal (Blutt *et al.*, 2003; Lloyd *et al.*, 2010).

Durante la infección, los antígenos (proteínas) y el ARN de rotavirus se encuentran comúnmente en múltiples órganos, incluso en ausencia de diarrea, lo cual demuestra que este antígeno viral, el ARN y/o las partículas virales entran a la circulación. Un estudio en niños fallecidos asociados a enfermedad por rotavirus, determinó la presencia de ARN viral en bazo, corazón, pulmón, riñón, testículos, vejiga, glándula suprarrenal y páncreas (Lynch *et al.*, 2003). Posteriormente otro estudio informó antigenemia en más del 90 % de niños con infección por rotavirus hasta

aproximadamente cinco días después del inicio de los síntomas, y por primera vez se demostró la presencia de virus infeccioso en el suero de estos pacientes (Blutt *et al.*, 2007). Por otro lado, los resultados de un estudio donde se detecta antigenemia y no viremia en sangre, sugieren que el virus llega a otros órganos por un mecanismo de transmisión posiblemente mediado por vesículas extracelulares (VEs) (Mosser y Ramig, 2003).

Los rotavirus infectan y se replican en muchas líneas celulares epiteliales humanas y animales con eficiencias variables (Ciarlet *et al.*, 2002). Sin embargo, no parece haber un claro tropismo entérico o especificidad de especie para la replicación de rotavirus en líneas celulares, comparado a la restricción de replicación encontrada *in vivo*. La línea celular MA104 de riñón de mono verde africano se ha utilizado ampliamente desde hace más de 40 años para estudios de propagación, infectividad y neutralización de rotavirus debido a que es altamente permisiva (Estes *et al.*, 1979; Kitamoto *et al.*, 1991), sin embargo, los mecanismos implicados en las últimas etapas de la infección, es decir, la maduración de las partículas virales y la salida celular, están menos caracterizados.

Rotavirus, pertenece al género *Rotavirus* en la familia *Reoviridae*. Los rotavirus son virus no envueltos de simetría icosaédrica con aproximadamente 100 nm de diámetro y un genoma de 18 500 pares de bases (pb) aproximadamente. Este genoma está formado por 11 segmentos de ARN de doble cadena (ARNdc), los cuales codifican para seis proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6, VP7) y seis no estructurales (NSP1 - NSP6). La capa interna del virión se conforma de 60 dímeros de VP2 que rodean al genoma viral y al complejo enzimático de replicación, constituido por VP1, que es una ARN polimerasa dependiente de ARN y VP3 con actividad de fosfodiesterasa, guanililtransferasa y metilasa. La capa intermedia de la partícula, está compuesta por 260 trímeros de VP6 que al ensamblarse sobre VP2 forman partículas de doble capa (DLPs, *double-layered particles*) que son transcripcionalmente activas. La capa más externa se compone por 260 trímeros de VP7 y 60 trímeros de VP4, que al ensamblarse sobre la capa de VP6 forman las partículas de triple capa (TLPs, *triple-layered particles*) (figura 1). VP7 y VP4 contienen los determinantes del tipo G (glicoproteína) y del tipo P (proteasa), respectivamente, y ambas son blanco de acción de anticuerpos neutralizantes (Estes y Greenberg, 2013). Para ser infeccioso, el virus requiere que la proteína VP4, que representa las espículas de la partícula viral, se

corte por tripsina en dos subunidades, VP8* y VP5*. Este procesamiento proteolítico es necesario para que el virus sea infectivo (Trask *et al.*, 2013).

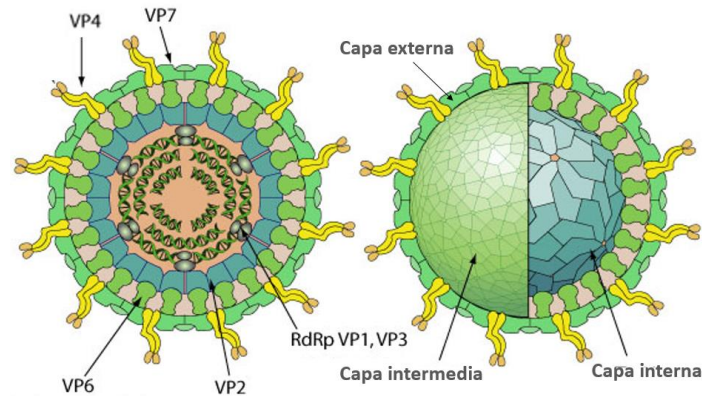


Figura 1 Diagrama de la TLP de rotavirus. En 2D (izquierda) y 3D (derecha). Rotavirus está formado por tres capas de proteínas. La capa interna está formada por la proteína VP2, que protege el genoma viral y donde también están presentes las proteínas VP1 y VP3. Encima se encuentra la capa intermedia formada por la proteína VP6 y la capa externa está formada por dos proteínas VP7 y VP4. Modificado de ©ViralZone 2011. Instituto de Bioinformática Suizo. (<http://viralzone.expasy.org/107>). RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN.

2.2 Ciclo de replicación de rotavirus

Interacción del virus con receptores y co-receptores celulares

El paso inicial en una infección viral es el reconocimiento y unión del virus a receptores específicos en la superficie celular, una interacción que frecuentemente desencadena cascadas de señalización celular que facilitan la entrada y replicación del virus. El tropismo restringido de rotavirus a los enterocitos maduros, sugiere que los tipos celulares que infecta expresan factores que se requieren para una infección y replicación eficiente (Hagbom *et al.*, 2011; Saxena *et al.*, 2015). La unión del virus a la superficie de la célula hospedera está mediada por la proteína de la capa externa VP4, a través de su dominio VP8* (Lopez y Arias, 2004). Algunos rotavirus de origen animal se unen a la superficie de la célula a través de sialoglicanos (como los gangliósidos GM1 y GD1a). También se demostró que la cepa RRV de simio, ingresa a la célula a través de dos pasos secuenciales, el primero mediado por la interacción inicial de VP8* con receptores que contienen ácido siálico, y el segundo a través de la interacción de la subunidad VP5* con receptores independientes de ácido siálico (Méndez *et al.*, 1996; Zárate *et al.*, 2000). Recientemente se ha demostrado que los rotavirus de origen humano interactúan mediante su proteína VP8* con antígenos de grupo sanguíneo (HBGA, *human histo-blood group antigens*). Estas interacciones

son dependientes del genotipo P de rotavirus, o sea del genotipo al que pertenezca la proteína VP4, y su estudio ha proporcionado nuevos conocimientos en cuanto al rango de restricción de hospederos, la transmisión interespecies de diferentes cepas de rotavirus y la epidemiología de rotavirus en diferentes poblaciones (Saxena *et al.*, 2015).

Posterior a la unión inicial de los virus a la célula, ya sea a través de ácido siálico o de glicanos del HBGA, se ha propuesto que interactúan con co-receptores proteicos celulares necesarios para su infección, por ejemplo las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 4\beta 1$, que unen motivos de ligando a integrinas presentes en VP5* o VP7 (Coulson *et al.*, 1997; Guerrero *et al.*, 2000). No todas las cepas de rotavirus requieren integrinas, pero todas las cepas probadas sí requieren Hsc70 (*Heat shock cognate 70*) para una infección eficiente (Guerrero *et al.*, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2010). Se ha reportado también que en células MA104 el gangliósido GM1, las subunidades de integrina $\alpha 2$ y $\beta 3$ y Hsc70 están localizadas en dominios de membrana resistentes a detergentes y que la integridad de estos dominios es fundamental para la entrada de rotavirus a las células (Isa *et al.*, 2004).

Es de destacar que el bloqueo de la interacción de rotavirus con cada uno de los receptores y co-receptores propuestos, a través del uso de proteasas, anticuerpos, péptidos, análogos de azúcares, proteínas que compiten por el sitio de unión o pequeños ARNs interferentes, decrece menos de un logaritmo la infectividad del virus. Estos hallazgos sugieren que: i) aún no se ha encontrado un factor de entrada más relevante para rotavirus, ii) que el virus tiene la plasticidad de usar más de una ruta de entrada o, iii) que los factores de entrada para rotavirus son redundantes (Arias *et al.*, 2015).

Internalización del virus

Después de las interacciones iniciales del virus con el receptor y co-receptores celulares, este ingresa a las células a través de endocitosis, que puede variar dependiendo de la cepa. Por ejemplo, la entrada de la cepa RRV requiere colesterol y dinamina y no depende de clatrina ni caveolina; sin embargo, la cepa de rotavirus bovino UK penetra por endocitosis mediada por clatrina (Gutiérrez *et al.*, 2010). Se ha reportado que los componentes del complejo endosómico para el transporte (ESCRT,

endosomal sorting complex for transport) también están involucrados en la entrada de rotavirus (Silva-Ayala *et al.*, 2013).

El desnudamiento del virus y su salida del endosoma al citoplasma, está mediado por la disminución de la concentración de calcio dentro del endosoma durante su maduración, lo que provoca la disociación de las proteínas de la capa externa de la partícula viral. Estas condiciones provocan un cambio conformacional de VP4, que origina el pliegue de VP5* sobre sí misma, adoptando una conformación tipo “paraguas” que expone un dominio hidrofóbico que desestabiliza la membrana endosomal y permite la liberación de las DLPs al citosol (Trask *et al.*, 2010), con lo cual comienzan a producirse y liberarse transcritos de ARN de cadena sencilla con polaridad positiva (ARN mensajeros, ARNm) que se requieren para la traducción de proteínas virales y que también sirven como templados para sintetizar la cadena negativa del ARN, para así dar lugar al genoma de la progenie viral formado por ARNdc (Silvestri *et al.*, 2004). Los ARNm se sintetizan dentro del virión de manera coordinada con su extrusión hacia el citoplasma a través de los poros que existen en las DLPs, llegando a ser detectables a una hora post-infección (hpi) (Patton, 1990).

Replicación del genoma viral, morfogénesis de las nuevas partículas virales y egreso de la célula

Una vez que la traducción de los ARNm virales ha producido una masa crítica de proteínas del virus, algunas de ellas se asocian para formar estructuras electrodensas al microscopio electrónico, denominadas viroplasmas. En estas estructuras, las proteínas y ARNs virales interactúan específicamente y se ensamblan en partículas subvirales hasta dar origen a las DLPs. Se asume que dentro de los viroplasmas los complejos de replicación primaria VP1/VP3/ARNm interactúan con un decámero de VP2, dando lugar a la formación del núcleo de la partícula viral, que es transcapsidado rápidamente por VP6, posibilitando el ensamble de las DLPs (Desselberger *et al.*, 2013). Las DLPs formadas geman de los viroplasmas hacia el lumen del retículo endoplásmico (RE). Este proceso está mediado por la interacción de la proteína VP6, localizada en la superficie de las DLPs, con la proteína no estructural del virus NSP4, que es una glicoproteína transmembrana residente en la membrana del RE (Taylor *et al.*, 1996) con actividad de viroporina, que favorece la liberación de calcio hacia el citoplasma. Al gemar a través de la membrana del RE, las DLPs adquieren una envoltura lipídica transitoria, en las cuales se encuentran presentes las proteínas

NSP4, VP7 y VP4. Por un mecanismo aún no definido, la cubierta de lípidos se pierde cuando las partículas envueltas migran hacia el interior del lumen del RE, perdiéndose también NSP4, y ensamblándose la capa externa del virus compuesta por VP7 y VP4 (Estes y Greenberg, 2013). Las TLPs formadas se liberan de células MA104 (células no polarizadas) por lisis (McNulty *et al.*, 1976) o bien a tiempos tempranos por un mecanismo no lítico que depende del citoesqueleto de actina (Trejo-Cerro *et al.*, 2018). Por otro lado se ha mostrado que los virus egresan de células epiteliales Caco-2 polarizadas (línea celular epitelial de carcinoma de colon) por un mecanismo vesicular no típico, que no causa la muerte inmediata de la célula (Gardet *et al.*, 2006). Los rotavirus se liberan mayormente hacia el lumen intestinal durante el curso natural de la infección. Además, también pueden pasar a la lámina propia y migrar a través de la circulación sanguínea y linfática llegando a otros órganos, aunque se desconoce la manera en que los rotavirus puede sobrevivir a estos procesos (Ramig, 2007). Se postula que la propagación a otros órganos puede ser de dos formas: 1-) por viremia asociada a células de inmunovigilancia como macrófagos, células dendríticas y linfocitos, que pueden migrar a los ganglios linfáticos regionales a través de vasos linfáticos y sanguíneos (Mossel y Ramig, 2003; Ramig, 2007) y 2-) por viremia libre de células, este último caso puede contribuir en un alto porcentaje a la propagación extra-intestinal de rotavirus, ya que casi todos los sueros resultan positivos para antígenos, ARN y/o virión infeccioso (Blutt *et al.*, 2007).

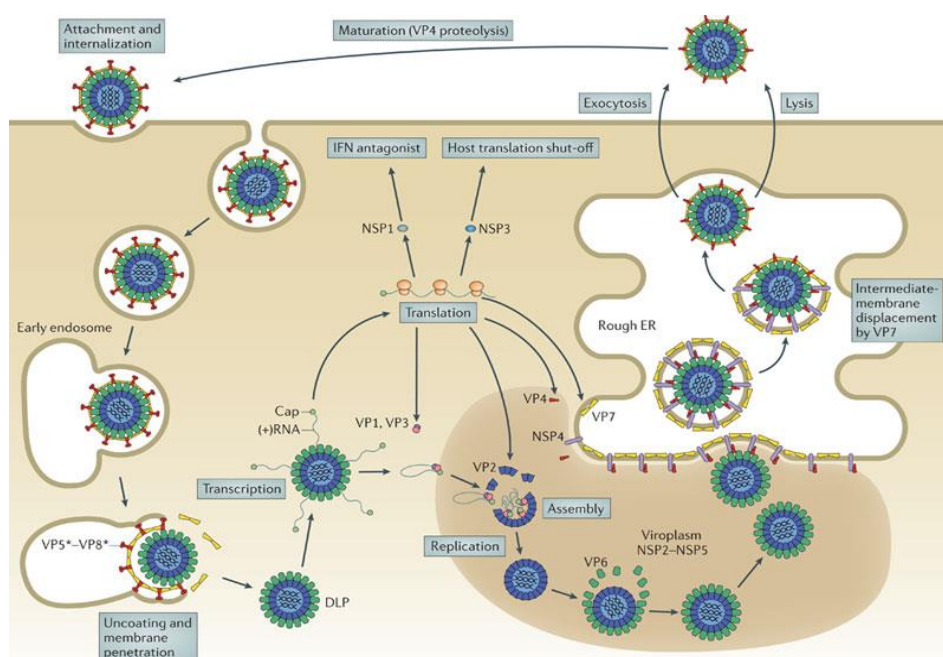


Figura 2 Ciclo replicativo de rotavirus. Los rotavirus interactúan con receptores a través de ácido siálico o de glicanos del HBGA y co-receptores de la superficie celular, incluyendo integrinas y a la

proteína Hsc70. La internalización se lleva a cabo por vía endocítica. La capa externa del virus se remueve y se libera la DLP al citosol, iniciando la síntesis de ARNm viral y la subsecuente síntesis de las proteínas del virus. Posteriormente se forman los viroplasmos, donde se asocian de manera específica ARNs y proteínas virales y se ensamblan las nuevas DLPs que se unen a NSP4 y esto permite su gemación al lumen del RE. Las DLPs adquieren una capa lipídica dentro del RE la cual se desestabiliza cuando la partícula adquiere su capa externa, compuesta por las proteínas VP7 y VP4. La partícula viral completa puede liberarse por lisis celular o por un mecanismo vesicular no lítico. Tomada de Shane *et al.*, 2012.

2.3 Vesículas extracelulares

La mayoría de los tipos celulares liberan vesículas al medio extracelular, las denominadas vesículas extracelulares (VEs), ajustando su biogénesis en función del estado fisiológico celular. Las VEs pueden derivarse de células normales, tumorales o apoptóticas y en este sentido contienen un subconjunto de proteínas, lípidos y/o ácidos nucleicos que las diferencian; de ahí la importancia de los mecanismos de clasificación selectiva de la carga, ya que afectarán directamente el destino y la función de la vesícula formada (Théry *et al.*, 2009). Los virus han desarrollado varias estrategias para modificar las vías celulares, secuestrando la maquinaria celular y utilizando mecanismos vesiculares de tráfico para el ensamblaje de la partícula y su eventual liberación de la célula. Se ha visto en muchos estudios que estas vías pueden converger con la biogénesis de VEs.

A pesar de que el término genérico de VEs se usa para referirse a todas las vesículas membranales secretadas, estas son realmente muy heterogéneas, lo cual ha obstaculizado en gran medida su caracterización. El rango de tamaño superpuesto, que puede variar típicamente entre 50 y 1000 nm o más (1–5 μm), la morfología similar y la composición versátil de moléculas de las vesículas, desafía los intentos actuales para diseñar una nomenclatura precisa para los diferentes tipos de VEs (Gould y Raposo, 2013; Kowal *et al.*, 2016). Durante las últimas dos décadas, las VEs se han nombrado según su origen (tipo de célula), tamaño, morfología y contenido de la carga. Basado en el conocimiento actual de su biogénesis hoy en día pueden ser divididas en dos categorías principales: exosomas y microvesículas (van Niel *et al.*, 2018). A pesar de que la generación de estos tipos vesiculares se produce en distintos sitios de la célula, existen mecanismos intracelulares y maquinarias de clasificación comunes que participan en la biogénesis de ambas entidades. En muchos casos, estos mecanismos compartidos dificultan la posibilidad de distinguir entre las diferentes subpoblaciones vesiculares (Colombo *et al.*, 2014).

Los exosomas incluyen pequeñas vesículas de membrana derivadas de endosomas multivesiculares (MVEs, *multi-vesicular endosomes*), mientras que las microvesículas se derivan de la membrana plasmática celular. En primer lugar, las cargas programadas para la secreción dentro de las VEs deben dirigirse al sitio de producción, ya sea en la membrana plasmática (para microvesículas) o en la membrana limitante de los MVEs (para exosomas). Las cargas se enriquecen en las vesículas en formación por un mecanismo paso a paso de agrupamiento y gemación, seguido de fisión y liberación de las vesículas (Raposo y Stoorvogel, 2013). Inicialmente se pensó que estas vesículas tenían la función de eliminar compuestos innecesarios para la célula, sin embargo, ahora se sabe de su participación en el intercambio de componentes entre células y como vehículos de señalización en procesos homeostáticos de células normales o como consecuencia del desarrollo de patologías (Colombo *et al.*, 2014; Yanez *et al.*, 2015). Debido a que la mayoría de los informes publicados de VEs se han centrado en sus funciones potenciales más que en sus orígenes, aún no está claro en la mayoría de los estudios qué tipo de vesículas es responsable de un efecto determinado. Los protocolos disponibles actualmente para recuperar VEs de sobrenadantes de cultivos celulares o muestras de biopsias líquidas, resultan en una población heterogénea de vesículas de origen desconocido (Willms *et al.*, 2016).

Una vez liberadas al espacio extracelular, las VEs pueden llegar a las células receptoras y entregar su contenido para obtener respuestas funcionales y promover cambios fenotípicos que afectarán su estado fisiológico o patológico. La comunicación intercelular mediada por VEs requiere el acoplamiento con la membrana plasmática, seguida por activación de receptores de superficie, señalización e internalización de las vesículas. Se conocen varios mediadores de estas interacciones, incluyendo tetraspaninas, integrinas, lípidos, lectinas y componentes de la matriz extracelular. Una vez que se han unido a las células receptoras, las VEs pueden permanecer en la membrana plasmática o pueden ser internalizadas por endocitosis dependiente de clatrina o independiente de clatrina, como macropinocitosis y fagocitosis, o también a través de endocitosis por caveolas y balsas lipídicas (van Niel *et al.*, 2018).

Microvesículas

Las microvesículas se originan por evaginaciones de la membrana citoplasmática y su rango de tamaños aproximado va de 100-1000 nm. La tasa de liberación de

microvesículas es un proceso regulado y en condiciones fisiológicas normales es generalmente baja (excepto en tumores donde se libera constitutivamente una gran cantidad), pero puede inducirse su liberación por infecciones o por la activación de receptores de superficie celular o apoptosis y el subsecuente incremento de calcio intracelular (György *et al.*, 2011). La gemación de la membrana plasmática durante la apoptosis genera microvesículas en forma de cuerpos apoptóticos (Hristov *et al.*, 2004). Los cuerpos apoptóticos son un tipo de microvesículas con un amplio rango de tamaño (50 nm - 5 µm) que se producen a partir de células senescentes o apoptóticas (El Andaloussi *et al.*, 2013).

Los mecanismos implicados en la biogénesis de microvesículas todavía se están revelando. La maquinaria molecular que participa en los diferentes pasos de la biogénesis de VEs, son en cierta medida comunes a exosomas y microvesículas (incluyendo proteínas ESCRT y la generación de ceramidas). Una excepción es el *flipping* de lípidos específicos en la membrana que se evagina, lo cual se ha descrito únicamente para la biogénesis de microvesículas. También ocurren cambios en la composición proteica y en los niveles de calcio (van Niel *et al.*, 2018), de cuya concentración dependen las maquinarias enzimáticas que dirigen los reordenamientos de lípidos, causando una curvatura de la membrana y la reestructuración del citoesqueleto de actina subyacente, favoreciendo así la formación de las microvesículas (Piccin *et al.*, 2007).

Las microvesículas contienen una gran variedad de proteínas, ARNs y microARNs (miARNs) (van Niel *et al.*, 2018). Al igual que los exosomas, poseen microdominios ricos en colesterol o balsas lipídicas, a los que se asocian proteínas comunes, como flotilina-1 y factor tisular. También contienen integrinas específicas, citoquinas, quimiocinas y más altos niveles de fosfatidilserina expuesta en la membrana externa (Meckes y Raab-Traub, 2011).

Gran parte de la comprensión actual de las funciones de las microvesículas provienen del estudio de cánceres, donde el proceso de tumorigénesis conduce a un incremento de la secreción de microvesículas implicadas en múltiples aspectos de la biología y la progresión de la enfermedad. También se han caracterizado como productos de plaquetas, glóbulos rojos y células endoteliales donde muestran una actividad pro-coagulante y contribuyen a la patogénesis de enfermedades autoinmunes; además

también tienen funciones en la presentación de antígenos, la comunicación neuronal y la propagación de patógenos (György *et al.*, 2011; Meckes y Raab-Traub, 2011).

Por su parte, los cuerpos apoptóticos derivados de células epiteliales intestinales, se ha caracterizado que median la transferencia de auto-antígenos a las células presentadoras de antígeno y favorecen la tolerancia (Huang *et al.*, 2000). Además, vesículas apoptóticas de células epiteliales intestinales infectadas con reovirus, pueden ser capturadas y procesadas por células presentadoras de antígenos para estimular la respuesta específica de células T (Fleeton *et al.*, 2004).

Exosomas

Los exosomas se producen por todos los tipos celulares. Son vesículas de bicapa lipídica cuyo diámetro oscila entre 30-150 nm, generalmente con una apariencia en forma de copa observada por microscopía electrónica de transmisión (MET). Diferentes estudios han demostrado aislamiento de exosomas *in vivo* a partir de líquidos corporales como sangre, orina, leche materna, líquido amniótico y líquido sinovial (Baietti *et al.*, 2012; Colombo *et al.*, 2013).

Debido a su origen endosomal, todos los exosomas poseen proteínas comunes de transporte y fusión (GTPasas, annexinas, flotilinas), tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82), proteínas de choque térmico (Hsp70, Hsc70, Hsp90), integrinas, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, entre otras proteínas que dependen de la célula parental de donde deriven los exosomas (Dinh *et al.*, 2016). ExoCarta (<http://www.exocarta.org>) es una base de datos curada manualmente de proteínas exosómicas, ARN y lípidos, que actualmente contiene información sobre 11 261 proteínas, 2375 ARNm y 764 miARN que se obtuvieron de 134 estudios de exosomas; todas estas proteínas se han empleado como marcadores positivos para detectar la presencia de exosomas. Estas pequeñas vesículas también poseen una composición lipídica característica enriquecida en colesterol, ceramida y fosfoglicéridos, entre otros (Vlassov *et al.*, 2012).

Los exosomas se generan como vesículas intraluminales (ILVs: *intraluminal vesicles*) en el lumen de endosomas durante su maduración a MVEs, que son intermediarios dentro del sistema endosomal. Este proceso involucra maquinarias de clasificación particulares que segregan las cargas en microdominios en la membrana limitante de los MVEs, con la consiguiente invaginación de esta membrana y la fisión

de pequeñas vesículas que secuestran el contenido citosólico. Estas se liberan posteriormente al medio extracelular por la fusión de los MVEs a la membrana plasmática. En estos procesos la maquinaria del ESCRT tiene un papel fundamental (van Niel *et al.*, 2018). Se ha demostrado que los exosomas también se pueden formar por un mecanismo independiente del ESCRT. Uno de estos requiere la generación de ceramida por esfingomielinasa neutra tipo II, que hidroliza la esfingomielina a ceramida (Trajkovic *et al.*, 2008). Las proteínas de la familia de las tetraspaninas también pueden regular la clasificación endosomal independiente del ESCRT, por ejemplo CD63 está involucrada en la clasificación endosomal en melanocitos (van Niel *et al.*, 2011) y en la biogénesis de exosomas en fibroblastos (Gauthier *et al.*, 2017). Así, parece que tanto la maquinaria dependiente como la independiente del ESCRT operan en la biogénesis de exosomas y sus aportes pueden variar dependiendo de las cargas que estos reclutan y el tipo de célula en cuestión (van Niel *et al.*, 2018). El paso final de la secreción de exosomas requiere la fusión de los MVEs con la membrana plasmática, proceso mediado por proteínas SNARE, al parecer activadas por calcio y los miembros de la familia sinaptotagmina (Jahn y Scheller, 2006). Además también implica reordenamiento del citoesqueleto de actina cortical (Sinha *et al.*, 2016) que es un paso común a todos los mecanismos que involucran secreción vesicular. Los MVEs también pueden fusionarse con los lisosomas para degradar el contenido presente en las ILVs, por lo tanto su ruta de tráfico determina si las ILVs se liberan de las células o no; la regulación del equilibrio entre la capacidad degradativa y secretora de los MVEs afecta la función celular. Un primer nivel de regulación de este balance es probablemente impuesto por las maquinarias de clasificación de los MVEs (Urbanelli *et al.*, 2013; Eitan *et al.*, 2016).

Los exosomas se secretan a los fluidos biológicos, de ahí que desempeñan un papel importante en la comunicación intercelular desencadenando una gran variedad de respuestas fisiológicas. Exosomas procedentes de células presentadoras de antígeno, expresan en su superficie moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II, que activan linfocitos T e inducen una respuesta inmune específica (Théry *et al.*, 2002). En enfermedades infecciosas portan ARNs y proteínas de los agentes infecciosos, permitiendo el diagnóstico de enfermedades, así como la detección de formas activas y latentes de infección intracelular (Vlassov *et al.*, 2012).

2.4 Vesículas extracelulares y virus

Existe una cifra cada vez mayor de estudios sobre la explotación viral de las vías celulares secretoras, desafiando en algunos casos los límites establecidos entre los grupos virales caracterizados tradicionalmente como envueltos y no envueltos. Dependiendo del virus y en algunos casos la etapa de su ciclo viral, los procesos intercelulares están bien orquestados para producir resultados celulares e inmunes específicos como la evasión del sistema inmune del hospedero, la propagación del virus, su replicación y persistencia viral (Wurdinger *et al.*, 2012).

Algunos virus secuestran a la maquinaria exosomal y pueden liberarse por esta vía junto con las ILVs. También secuestran esta ruta para el empaquetamiento y transferencia de proteínas funcionales, ARNm, miARNs y otros componentes citosólicos (Wurdinger *et al.*, 2012). Los exosomas que contienen viriones pueden proporcionar otra vía para la propagación de la infección y al mismo tiempo proteger del reconocimiento inmune. Mientras que los exosomas que contienen productos virales, pueden exhibir diversos efectos pro-inflamatorios y antiinflamatorios sobre las células diana (Robbins y Morelli, 2014).

La mayoría de los virus envueltos poseen las proteínas involucradas en la entrada a la célula hospedera, pero generalmente no codifican para proteínas involucradas en la salida viral. Usualmente se ensamblan y geman de la membrana plasmática, pero un número importante de virus envueltos geman dentro de compartimientos internos, de ahí la existencia de características comunes entre el ensamblaje y liberación de virus y exosomas (Schorey *et al.*, 2015). Las proteínas virales (generalmente estructurales) pueden reclutar proteínas involucradas en el transporte vesicular, específicamente miembros del ESCRT. Se ha descrito la existencia de dominios análogos en proteínas virales que interactúan con la maquinaria del ESCRT. En virus de inmunodeficiencia humana (VIH), filovirus, arenavirus, rabdovirus y reovirus, se identificó un dominio en proteínas estructurales que se une a TSG101 (*tumor susceptibility gene 101*) (Wirblich *et al.*, 2006). También se conoce un dominio de unión a Alix (*ALG-2-interacting protein X*) en algunos retrovirus, el cual facilita la liberación en paramyxovirus, arenavirus y flavivirus (Votteler y Sundquist, 2013)

En VIH, la proteína accesoria Nef (*Negative Regulatory Factor*) se empaqueta en vesículas y se disemina, afectando procesos tales como la degradación lisosomal de péptidos virales y el cambio de clase de anticuerpos, evitando así el reconocimiento

del virus por el sistema inmune (Xu *et al.*, 2009). Las células infectadas con virus de Epstein-Barr (EBV) liberan exosomas conteniendo miARNs reguladores codificados por el virus que reprimen la traducción de determinados genes en células no infectadas (Pegtel *et al.*, 2010). Estudios recientes en virus de hepatitis C (VHC) han mostrado que el ensamblaje del virus, así como su liberación de hepatocitos, está ligado a la vía secretora de exosomas (Tamai *et al.*, 2012) y que los exosomas derivados de hepatocitos pueden transferir ARN viral a células dendríticas desencadenando su activación y la producción de IFN- α (Dreux *et al.*, 2012). Existen eventos de transferencia mediante exosomas, de ARN subgenómico de VHC competente para la replicación, lo cual lleva al establecimiento de la replicación del ARN viral en células permisivas, aún en presencia de anticuerpos neutralizantes (Ramakrishnaiah *et al.*, 2013).

En contraste se ha pensado durante mucho tiempo que los virus no envueltos pueden liberarse después de la lisis celular, por lo que su transporte y liberación se han investigado menos a fondo. Sin embargo, los estudios utilizando virus de simio 40 (Clayson *et al.*, 1989) y poliovirus (Tucker *et al.*, 1993) indicaron que los virus no envueltos también pueden liberarse antes de la lisis celular en un dominio particular de la membrana plasmática, asociando su salida a mecanismos vesiculares, que pueden implicar la liberación de exosomas o microvesículas y que no causan la muerte inmediata de la célula. Se ha determinado que las vesículas que contienen virus son mucho más eficaces para infectar células, que las partículas virales libres (Santiana *et al.*, 2018).

Feng y colaboradores en el 2013 publicaron resultados de sus estudios en virus de hepatitis A (VHA), donde la distinción clásica entre virus envuelto y no envuelto fue cuestionada, al describir la adquisición de envoltura derivada de membranas celulares por un virus considerado tradicionalmente desnudo. Los experimentos mostraron la existencia de dos poblaciones de partículas virales en un gradiente de densidad indicando su posible asociación con membrana. El análisis microscópico de la fracción que flotaba en el gradiente, permitió la observación de partículas virales dentro de pequeñas vesículas membranosas semejantes a exosomas, cuya biogénesis dependía de las proteínas Vps4B y ALIX, ambas asociadas a la biogénesis de exosomas. VHA envuelto se detectó en sangre circulante y este no se neutralizó por

anticuerpos, indicando así un nuevo mecanismo para evadir la respuesta inmune neutralizante (Feng *et al.*, 2013).

Estudios en virus de hepatitis E (VHE), mostraron virus cubiertos con membranas celulares, similar a los virus envueltos, presentes en sangre circulante y sobrenadante de cultivos celulares (Takahashi *et al.*, 2008). Se ha determinado que TSG101 y la actividad de las proteínas vacuolares Vps4A y Vps4B están involucradas en la liberación del VHE, indicando que usan la vía exosomal para ello (Nagashima *et al.*, 2011). Además mediante MET del medio de diferentes líneas celulares infectadas, se determinó la presencia de virus extracelular asociado a membranas con un diámetro aproximado de 50 nm. Dentro de MVEs presentes en el citoplasma de estas mismas células, también se observaron partículas virales asociadas a membranas de un tamaño similar. Por inmunofluorescencia, se detectó en el interior de los MVEs, la colocalización de las proteínas virales con CD63. En conjunto estos hallazgos indican que el VHE asociado a membranas, se libera junto con ILVs contenidas en los MVEs, a través de la vía exosomal (Nagashima *et al.*, 2014).

Robinson y colaboradores detectaron al virus Coxsackie dentro de vesículas que al liberarse conducen al virus por una nueva vía de difusión independiente del ESCRT, donde la vía autofágica parece desempeñar un papel crucial en el desprendimiento de las vesículas y la liberación del virus (Robinson *et al.*, 2014).

Un estudio reciente de poliomavirus JC también mostró virus extracelular asociado a vesículas, cuya incubación con antiseros anti-poliomavirus JC no ejerce efecto sobre la infección del virus asociado a vesículas y sí sobre el virus libre. Además el virus pudo infectar las células blanco de manera independiente de receptores virales, ya que la degradación del receptor celular no impidió la entrada del virus asociado a vesícula. Estos datos explican cómo células cerebrales que carecen de receptores virales se infectan con poliomavirus JC y como este virus puede evadir mecanismo de inmunidad, debido a su asociación a vesículas (Morris-Love *et al.*, 2019).

3. ANTECEDENTES

3.1 Vesículas extracelulares y rotavirus

La salida de rotavirus de las células MA104 se reporta que ocurre por lisis celular; sin embargo, en cultivos de células intestinales polarizadas se ha detectado la presencia de virus en medio de cultivo previo a la lisis celular, apuntando a una ruta de salida alternativa mediante un transporte vesicular no típico (Jourdan *et al.*, 1997; Cevallos Porta *et al.*, 2016).

La investigación del evento de transporte y liberación de la cepa RRV de rotavirus en células Caco-2 polarizadas, demostró que la salida del virus ocurre casi exclusivamente por el lado apical antes de la detección de lisis celular, describiendo por primera vez la existencia de un transporte vesicular no convencional desde el RE a la membrana apical, el cual no incluye el transporte a través del aparato de Golgi ni de lisosomas. Además se observó que los viriones intracitoplasmáticos están restringidos dentro de vesículas lisas en la región apical y cerca de la trama terminal (Jourdan *et al.*, 1997; Cevallos Porta *et al.*, 2016).

Otro estudio de células Caco-2 infectadas con la cepa RRV, mostró la liberación de una población heterogénea de VEs con las proteínas Hsp y TGF- β 1 (*transforming growth factor β*), con capacidad de inhibir la viabilidad y proliferación de linfocitos T. Ambas proteínas se liberan asociadas con vesículas que expresan marcadores de exosomas (CD63, acetilcolinesterasa (AChE) y MFG-E8), concentrados por filtración/ultracentrifugación. La proteína VP6 de rotavirus coinmunoprecipitó con la tetraspanina CD63 presente en las vesículas aisladas, y colocalizó con CD63, CD9 y CD26 en células infectadas, sugiriendo que la proteína viral está asociada con estas vesículas, y esta asociación se produce desde el citoplasma celular (Barreto *et al.*, 2010).

Tradicionalmente en la línea celular MA104, se había descrito durante las fases tardías del ciclo replicativo viral, que el virus se retenía en el lumen del RE hasta la lisis celular (Musalem y Espejo, 1985). A pesar de esto, los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio manifiestan que en tiempos tempranos el virus puede liberarse de estas células por un mecanismo que no compromete la viabilidad celular. Una parte de las partículas virales extracelulares flotan en un gradiente de

densidad de iodixanol, lo cual sugiere que se encuentran asociadas a estructuras lipídicas de baja densidad. Una fracción infectiva del gradiente fue analizada por MET, mostrando virus extracelular asociado a estructuras membranosas. También en el citoplasma, se determinó la presencia de virus dentro de lo que parecieran ser estructuras membranosas, muy próximas a la membrana plasmática y lejanas a los viroplasma, apuntando que estas estructuras pudieran fungir como el medio de liberación del virus (Trejo-Cerro *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta los antecedentes planteados el proyecto está encaminado a caracterizar la asociación de rotavirus con VEs en células MA104.

4. HIPÓTESIS

La infección de células MA104 con rotavirus conduce a la presencia de partículas virales asociadas a vesículas en el medio extracelular.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la asociación de rotavirus con vesículas, en el medio extracelular de células MA104 infectadas.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar los tiempos previos a la lisis celular, donde se libera la mayor cantidad de virus asociado a estructuras membranosas.
2. Caracterizar las estructuras membranosas a las cuales está asociado el virus.
3. Estudiar los efectos de la inhibición y estimulación de la secreción de vesículas, sobre la asociación del virus liberado con vesículas extracelulares.
4. Analizar mediante microscopía confocal y electrónica la asociación del virus con las vesículas.
5. Determinar si la asociación del virus con vesículas extracelulares promueve su infectividad.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Células y virus

Se empleó la línea celular MA104, derivada de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) y se creció en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) - *Advance* (Thermo Scientific, USA) suplementado con 5 % de suero fetal bovino a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5 %. Se trabajó con la cepa *Rhesus rotavirus* (RRV) activada previamente con 10 µg/mL de tripsina a 37°C por 30 minutos e inactivada con inhibidor de tripsina al 1 % (Gibco Life Technologies) y propagada en células MA104, para la producción de lisado viral. Para la propagación del virus, se inocularon células MA104 con RRV (MOI = 1) por 1 h a 37°C. Posteriormente el virus no adsorbido se retiró mediante lavados y se agregó medio mínimo esencial de Eagle (MEM), incubándose por un período de 14 h a 37°C. Pasado este tiempo las células se lisaron mediante tres ciclos de congelación – descongelación y el virus cosechado fue activado nuevamente e inactivado, titulado y almacenado en alícuotas a -70°C para experimentos posteriores.

7.2 Anticuerpos y reactivos

El anticuerpo policlonal contra la partícula viral completa (α -TLP) se produjo en nuestro laboratorio. Los anticuerpos monoclonales HS2 dirigido contra la subunidad VP5* y Ac-159 contra VP7 fueron donados por H.B. Greenberg (Universidad de Stanford, USA). Los anticuerpos contra las proteínas celulares CD63 (Santa Cruz, USA), Hsp70 (Stressgen Biotechnologies, USA), proteína disulfuro isomerasa (PDI) y Alix (Aviva Systems Biology, USA) se adquirieron comercialmente. En los ensayos de formación de focos se utilizó proteína A acoplada a peroxidasa y en los western blot se usaron anticuerpos secundarios anti-conejo acoplado a peroxidasa o anti-ratón acoplado a peroxidasa (Perkin Elmer Life Sciences, USA). Los anticuerpos secundarios para las inmunofluorescencias fueron anti-conejo y anti-ratón acoplados a Alexa-Fluor 568 y Alexa-Fluor 488 respectivamente (Molecular Probes, USA).

Para la purificación de VEs se usó polietilenglicol 6000 (PEG) (Sigma, México).

Para los tratamientos químicos se usó bafilomicina A1, cloruro de amonio (NH₄Cl) y GW4869 (Sigma, México). Dimetil sulfóxido (DMSO) se usó como un control, a la concentración usada para disolver bafilomicina A1 y GW4869.

7.3 Viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó determinando la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), medida en el sobrenadante de las células, utilizando el kit Lactato Dehydrogenase kit TOX-7 (Sigma, México) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

7.4 Titulación viral por ensayo de formación de focos

El título viral se determinó mediante ensayo de formación de focos. Las monocapas confluentes de células MA104 crecidas en placas de 96 pozos se lavaron dos veces con MEM y se incubaron 1 h con diluciones seriadas del virus, previamente activado e inactivado, con tripsina e inhibidor de tripsina respectivamente. Posteriormente las células se lavaron dos veces con MEM para retirar el virus no absorbido y se incubaron 14 h a 37°C. Después de este tiempo, las células se lavaron con buffer de fosfatos 1X (PBS) y se fijaron con acetona 80 % por 20 minutos. Luego se incubaron con α -TLP (1:2500) 2 h a 37°C. Pasado este tiempo se lavaron las células con PBS y se incubaron con proteína A acoplado a peroxidasa (1:2500) 1 h a 37°C. Por último, las células se incubaron con carbazol y peróxido de hidrógeno aproximadamente cinco minutos, hasta observar la coloración rojiza de las células infectadas. Las unidades formadoras de focos por mililitro (UFF/ml) se contaron en un microscopio invertido (Nikon, Japón).

7.5 Inmunodetección de proteínas

Las proteínas (marcadores vesiculares y/o virales) provenientes de los diferentes ensayos realizados, se precipitaron con metanol-cloroformo-agua y se resuspendieron en buffer Laemmli [Tris-HCl 50 mM (pH 6.8), SDS 2 %, azul de bromofenol 0.1 %, glicerol 10 %, β -mercaptoetanol 1 %]. Se hirvieron las muestras por cinco minutos y se separaron las proteínas por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida 10 %. Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Milipore, Alemania) por 60 minutos a 50 V y 150 mA. La membrana se bloqueó 1 h a temperatura ambiente en agitación, con solución de leche descremada (Carnation) 5 % en PBS. Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en PBS con leche 0.1 % durante 14 h en agitación a 4°C. La membrana se lavó tres veces por 10 minutos con PBS-Tween 0.1 % y se añadió el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa por 2 h en agitación a temperatura ambiente. Finalmente se lavó la membrana y se detectaron las proteínas utilizando el sistema Western Lightning

(Perkin Elmer, USA) exponiéndose a una película hipersensible Kodak (Rochester, USA).

7.6 Cinética de salida viral

Para realizar la cinética de salida viral las células MA104 crecidas en placas de 48 pozos se infectaron (MOI = 5) y a diferentes tiempos post-infección (6, 8, 10, 12, 14 hpi) se colectaron los sobrenadantes y se cosecharon las monocapas celulares, resuspendiéndolas en MEM y lisándolas por congelación-descongelación. Los sobrenadantes se centrifugaron a 500 g por cinco minutos para eliminar células despegadas y/o detritos celulares. Los títulos virales de las monocapas y de los sobrenadantes tratados, se determinaron por ensayo de formación de focos en placas de 96 pozos. Los sobrenadantes se analizaron también por ensayo de protección del virus a tripsina.

7.7 Ensayo de protección del virus a tripsina

Los sobrenadantes obtenidos de células MA104 infectadas se dividieron en volúmenes iguales y se trataron de dos formas: unos solamente se activaron con tripsina y se inactivaron con inhibidor de tripsina y otros se trataron previamente con tritón X-100 0.2 % (Sigma, México) por 30 minutos a 37°C, seguidos del tratamiento de activación e inactivación del virus. Con diluciones seriadas de los sobrenadantes tratados de estas dos maneras, se infectaron células MA104 y los títulos virales se determinaron por ensayo de formación de focos. Se realizó un control de TLPs purificadas con diferentes concentraciones de tritón X-100.

7.8 Purificación de VEs

Para la purificación de las VEs se realizó un protocolo de centrifugación diferencial, seguido de precipitación con polietilenglicol (Rider *et al.*, 2016). Los sobrenadantes cosechados (20 ml) a las 10 hpi derivados de cultivos de MA104 infectadas (MOI = 5) en frascos de 150 cm², se centrifugaron inicialmente a 500 g por cinco minutos. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 2000 g durante 30 minutos, el *pellet* resultante se resuspendió en 100 µl de PBS filtrado estéril y se guardó a 4°C (fracción 1: F1) y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 10 000 g por 40 minutos (rotor SW28, Beckman) y el *pellet* obtenido se resuspendió en 100 µl de PBS y se guardó a 4°C (fracción 2:F2). El sobrenadante se incubó con PEG 16 % y NaCl 1 M, volumen 1:1 durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizó una centrifugación a 10 000 g por 1 h a 4°C (rotor SW28, Beckman) y se desechó el sobrenadante. El *pellet* se

resuspendió en PBS filtrado estéril y se ultracentrifugó a 120 000 g por 2 h (rotor SW55 Ti Beckman), se desechó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 100 µl de PBS filtrado estéril, agitando durante 30 minutos para resuspenderlo y luego se guardó a 4°C (fracción 3: F3). Las tres fracciones obtenidas durante la purificación, se analizaron mediante varios experimentos: western blot, ensayo de formación de focos, análisis de trayectoria de nanopartículas y MET. Se realizó un control de TLPs purificadas con diferentes concentraciones de PEG.

7.9 Análisis de trayectoria de nanopartículas

Para determinar la concentración de partículas y su distribución en cuanto a tamaños en cada fracción de VEs purificada, células MA104 se infectaron (MOI = 5) y se cosechó el sobrenadante a las 10 hpi. Este se purificó por el método de purificación de VEs descrito previamente y las fracciones obtenidas se diluyeron 1:100 en PBS filtrado estéril, para ser analizadas con el equipo Nanosight NS300, en colaboración con el Dr. Iván Quevedo Partida, campus Satélite, Universidad Iberoamericana. Del mismo modo se analizó el sobrenadante de células no infectadas. Las muestras se analizaron sin flujo y se tomaron cinco videos por cada condición. Se midieron controles del PBS filtrado estéril usado para diluir las muestras y de TLPs purificadas.

7.10 Tratamientos químicos de inhibición y estimulación de exosomas

Las monocapas confluentes de células MA104 crecidas en placas de 48 pozos se incubaron con la cepa RRV (MOI = 5) durante una hora a 37°C, se lavaron las células y se incubaron con medio (MEM). Cuatro horas después se retiró el medio y las células se trataron con GW4869 (10 µM), bafilomicina A1 (50 nM) o NH₄Cl (25 mM) por 6 h a 37°C. Luego los sobrenadantes se cosecharon y centrifugaron a 500 g por cinco minutos para eliminar células despegadas y/o detritos celulares y las células de la monocapa se resuspendieron en medio y se lisaron por tres ciclos de congelación-descongelación. A los sobrenadantes se les realizó ensayo de protección del virus a tripsina. Se determinó en cada caso el título viral por ensayo de formación de focos en placas de 96 pozos. El tratamiento con NH₄Cl se realizó del mismo modo descrito anteriormente en frascos de 150 cm², para cosechar una mayor cantidad de VEs y purificarlas. En cada fracción se determinaron marcadores de vesículas o virus por western blot o dot blot.

7.11 Inmunofluorescencia

Las células MA104 se crecieron en cubreobjetos de vidrio en placas de 48 pozos y una vez confluentes, se infectaron con RRV (MOI = 5). Concluido el tiempo post-infección correspondiente, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído 2 % (Sigma, USA) por 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con solución de NH₄Cl 50 mM y se permeabilizaron por 15 minutos con tritón X-100 0.2 % en solución de bloqueo (albúmina sérica bovina 1 % en solución de NH₄Cl 50 mM). Posteriormente las células se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo primario correspondiente para cada experimento: exosomas (CD63, Alix, Hsp70) y rotavirus (α -TLP). Posteriormente las células se lavaron con solución de NH₄Cl 50 mM y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a los fluoróforos Alexa-fluor 488 y Alexa-fluor 568 según el caso, por 2 h a temperatura ambiente. Finalmente la monocapa se incubó con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 30 nM (Invitrogen TM, USA) por 20 minutos. Los cubreobjetos se montaron con Citifluor AF1 (Electron Microscopy Sciences, USA) en portaobjetos. Las muestras se observaron con un microscopio confocal (Microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico).

7.12 Determinación de la infectividad viral mediada por vesículas

Los sobrenadantes cosechados a las 10 hpi derivados de cultivos de células MA104 infectadas con la cepa RRV (MOI = 5), se centrifugaron a 500 g por cinco minutos. El sobrenadante resultante se centrifugó a 2000 g durante 30 minutos, el *pellet* obtenido se resuspendió en 500 μ l de buffer salino de tris 1X (TBS) (fracción 1: F1) y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 10 000 g por 40 minutos (rotor SW28, Beckman) y el *pellet* obtenido se resuspendió en 500 μ l de TBS (fracción 2: F2) y el sobrenadante se ultracentrifugó a 120 000 g por 2 h (rotor SW28, Beckman), se desechó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 500 μ l de TBS (fracción 3: F3). Las vesículas procedentes de cada fracción se purificaron con el kit "MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS" (Life Science, Japón). Para las fracciones purificadas se diseñó un esquema de tratamientos donde cada una de las fracciones (F1, F2 y F3), se dividieron en volúmenes iguales y se incubaron durante 30 minutos con tripsina 1 %, tritón X-100 0.2 % o sólo medio (MEM) y a su vez cada tratamiento fue posteriormente incubado o no, con anticuerpo monoclonal neutralizante (Ac-159) durante 1 h a 37°C. Posteriormente monocapas confluentes de células MA104

crecidas en placas de 96, se incubaron con diluciones seriadas de cada condición (seis condiciones por cada fracción) durante 2 h y luego se lavaron con medio y se dejaron incubando 14 hpi a 37°C. El título viral en cada caso se determinó por ensayo de formación de focos.

7.13 Microscopía electrónica de transmisión

Los análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET) se realizaron en la unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Biotecnología de la UNAM por la Dra. Guadalupe Zavala. Para ello las VEs del sobrenadante de células infectadas, se purificaron mediante el kit “MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS” como se describió anteriormente. Se tomaron 10 µl de cada fracción purificada, se fijaron en celdas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo (3 %) en 70 % de metanol, analizándose cada muestra con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 900 (Gatan, Inc., Pleasanton, California, USA).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 La cepa RRV de rotavirus se libera de células MA104 antes de la lisis celular

Se ha reportado que la formación de nuevas partículas virales comienza a las 4 hpi y la mayor parte se encuentra ensamblada a las 8 hpi (Martínez, 2015). Sin embargo, no son claros los tiempos post-infección a los cuales el virus comienza a liberarse de la célula, para lo cual se realizó la cinética de salida de la cepa RRV en células MA104, desde tiempos tempranos (figura 3A). Para comprobar que la presencia del virus en el sobrenadante a tiempos tempranos, no se debe a daño o muerte celular por lisis debido a la propia infección viral; se realizó un ensayo para determinar la cantidad de enzima LDH liberada al medio, lo cual indica el grado de afectación de la integridad celular (figura 3B).

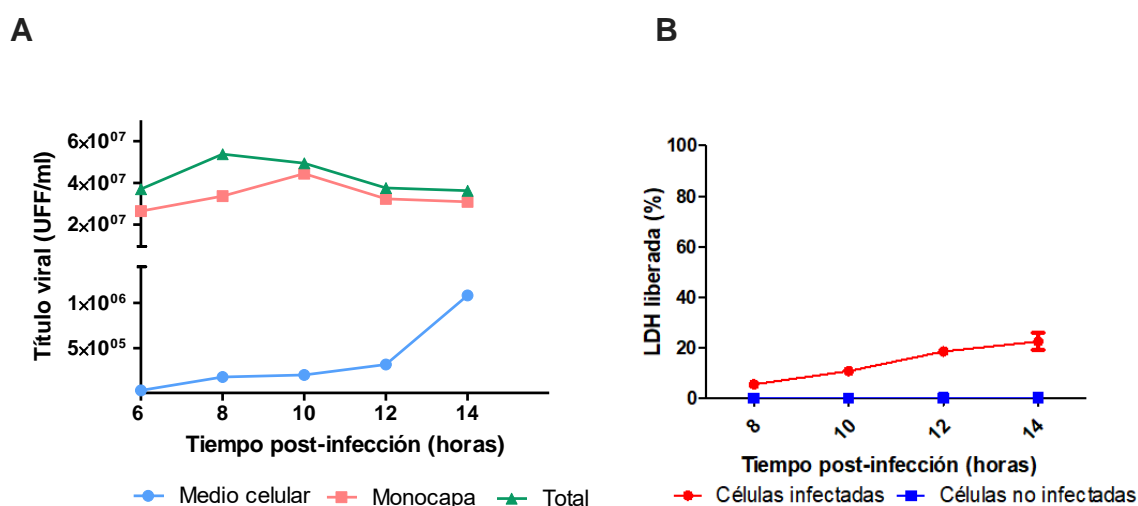


Figura 3 Cinética de salida viral desde tiempos tempranos de la infección, previo a la lisis celular. Las células se infectaron con RRV (MOI = 5) y se incubaron durante el tiempo indicado a 37°C. En cada uno de los tiempos se cosechó el medio extracelular, las células de la monocapa y el total (medio celular + monocapa celular). El virus presente en cada uno se determinó por ensayo de formación de focos; los datos se expresan como UFF/ml por cada hora post-infección. (A). La Cantidad de LDH liberada en el sobrenadante se expresa como porcentaje de LDH liberada al medio y se comparó con un control realizado en MA104 no infectadas (B). Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3).

Rotavirus es un virus no envuelto y al igual que el resto de los virus clasificados así, se pensaba que su liberación ocurría por lisis de la célula; de ahí que su transporte y liberación fueron mecanismos investigados menos a fondo. Sin embargo, varios estudios demuestran la salida de virus no envueltos (ejemplo: virus de simio 40 y

poliovirus) antes de la lisis celular, asociados a mecanismos vesiculares que implican la liberación de exosomas y/o microvesículas y que no causan la muerte inmediata de la célula (Clayson *et al.*, 1989; Tucker *et al.*, 1993).

Los resultados del presente trabajo muestran la presencia de virus infectivo en el sobrenadante desde las 6 hpi, con un título muy bajo ($\sim 2.87 \times 10^4$ UFF/ml) pero que va aumentando con el tiempo hasta las 14 hpi, tiempo en el que las células comienzan a lisarse en mayor proporción y se detecta un aumento abrupto del título viral en el sobrenadante (figura 3A). En células MA104 tradicionalmente se ha reportado que rotavirus se libera mediante lisis celular (Musalem y Espero; 1985), pero nuestros resultados y los obtenidos por Trejo-Cerro y colaboradores en el 2018, demuestran que una parte del virus se encuentra en el medio celular a tiempos tempranos de la infección. Trejo-Cerro reporta la presencia de virus a partir de las 9 hpi (Trejo-Cerro *et al.*, 2018). En este trabajo se detecta el virus desde las 6 hpi, lo cual puede deberse a que se infectaron las células MA104 a una MOI más alta que permitió la detección de virus en tiempos aún más tempranos.

La medición de la liberación de LDH (figura 3B) permitió evaluar indirectamente la integridad de la membrana celular. Los resultados muestran que hasta las 10 hpi las células no presentan alteración de su integridad celular debido a la infección con RRV. Esto sugiere que el virus presente en el sobrenadante al menos hasta las 10 hpi, se libera por un mecanismo no lítico. El aumento de LDH a las 12 hpi, evidencia afectación de la integridad celular debido a la propia infección viral. Esta observación implica la liberación de contenido citoplasmático al medio celular, así como la presencia de estructuras celulares membranosas en el medio, que podrían interferir en el estudio de la asociación del virus con VEs, existiendo la posibilidad de una asociación a membranas debido a eventos de daño o muerte celular por lisis y no específicamente a la asociación con vesículas durante su salida de la célula por un mecanismo no lítico. Resultados similares a los obtenidos en este estudio, se reportaron por Trejo-Cerro y colaboradores, cuando se determinó la viabilidad de las células MA104 infectadas con la cepa RRV, por reducción de rezarsurina, mostrando afectación de la integridad celular a las 12 hpi (Trejo-Cerro *et al.*, 2018). Así mismo se reportó la pérdida de la integridad de la membrana plasmática con colorante azul tripano, a las 12 hpi en MA104 infectadas a alta MOI con la cepa SA11 de rotavirus de simio (Santiana *et al.*, 2018). De igual manera Arnold y colaboradores, describen

que la infección de células MA104 a una alta MOI ($MOI \geq 3$), produce un visible efecto citopático: redondeo de células, desprendimiento y lisis celular, comenzando aproximadamente a las 10 hpi (Arnold *et al.*, 2012).

En células Caco-2 polarizadas el estudio del transporte y liberación de la cepa RRV, demostró que la salida del virus ocurre casi exclusivamente por el lado apical, antes de la detección de lisis celular, describiendo por primera vez la existencia de este evento, que asocian a un transporte vesicular no convencional desde el RE a la membrana apical (Jourdan *et al.*, 1997). Mientras que en células H69 de colangeositos humanos, infectadas con SA11, se mostró la liberación del 100 % del virus a las 72 hpi sin cambios significativos en la permeabilidad celular (Santiana *et al.*, 2018).

8.2 Presencia de virus extracelular protegido al tratamiento con tripsina

Con los antecedentes existentes de egreso viral de virus no envuelto coligado a la formación de VEs, rotavirus pudiera encontrarse asociado a vesículas en el medio extracelular. Para determinar la protección del virus ante el procesamiento proteolítico con tripsina de la proteína VP4, que sugiere la presencia de estructuras membranosas que protegen al virus, se realizaron ensayos de protección a tripsina a los sobrenadantes cosechados a diferentes horas post-infección.

Para ello se dividieron volúmenes iguales del medio cosechado de las células infectadas durante diferentes tiempos y una parte se trató con tritón X-100 para solubilizar las membranas y luego se activó el virus con tripsina, mientras que la otra parte del sobrenadante únicamente se activó con tripsina (figura 4). En este último caso se ve limitado el acceso de la proteasa al virus de dos maneras posibles: (1) totalmente en caso de encontrarse la partícula completa del virus dentro de estructuras membranosas y (2) parcialmente en caso de asociarse a estructuras membranosas pero por la parte externa de estas, quedando al menos una parte del virus accesible a tripsina. Mientras que con el tratamiento previo con tritón X-100 antes de la activación con tripsina, las estructuras membranosas asociadas al virus, se solubilizan con el detergente y posteriormente la tripsina tiene acceso a toda la estructura del virus para el procesamiento de la proteína VP4 en la capa externa de la partícula, mediante cortes proteolíticos.

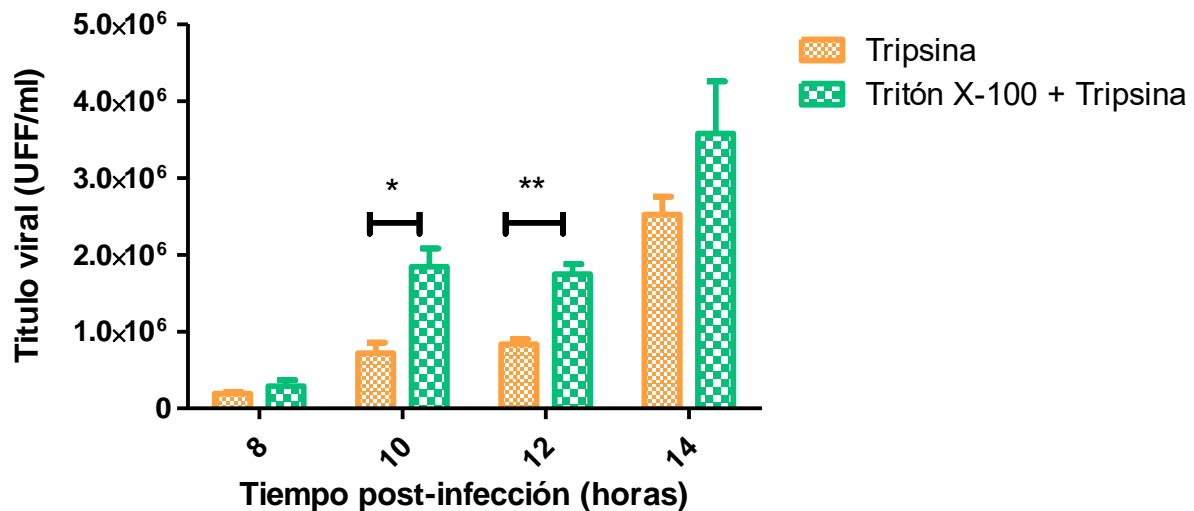


Figura 4 Ensayo de protección a tripsina de virus extracelular a diferentes tiempos post-infección. Las células se infectaron (MOI = 5) y se incubaron a 37°C, el medio celular se cosechó a las 8, 10, 12 o 14 hpi. Se realizó ensayo de protección a volúmenes iguales del sobrenadante, los cuales posteriormente se titularon por ensayo de formación de focos. Los datos se expresan como UFF/ml en cada tiempo post-infección. Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3).

Para determinar que el tratamiento con tritón X-100 por sí solo no afecta la infectividad de rotavirus, como control, se incubaron TLPs purificadas con diferentes concentraciones de tritón X-100 y se determinó que no ejerce efecto alguno sobre la infectividad del virus (datos no mostrados).

Los resultados del ensayo de protección mostraron diferencias en el título viral de ambas condiciones, pero la relación entre ambos tratamientos varía según el tiempo post-infección al que se cosechó el medio celular (figura 4). Los tiempos donde se observó una mayor diferencia entre los títulos virales de los sobrenadantes en función del tratamiento empleado, fue a las 10 hpi (~ 60 % del virus está protegido a tripsina) y a las 12 hpi (~ 52 % del virus está protegido a tripsina). Se manifiesta así la presencia de virus protegido a tripsina liberado por las células infectadas. Sin la solubilización con tritón X-100 de las membranas asociadas al virus antes de la activación con tripsina, se observa un título viral más bajo, pues se limita el acceso de la tripsina a los sitios de corte que se requieren para la activación y posterior entrada del virus, por lo cual menor número de UFF/ml son determinadas en este caso.

Similar a estos resultados, Feng y colaboradores observaron que el VHA, un picornavirus "no envuelto", se libera de las células que infecta en ausencia de lisis

celular y encontraron en el medio, dos poblaciones virales extracelulares: una de partículas libres y otra de partículas dentro de vesículas que representaban aproximadamente el 79 % del virus total. Ambas poblaciones virales mostraron igual infectividad, pero el tratamiento con cloroformo redujo en dos logaritmos la infectividad de la población asociada a vesículas, mientras que en la de partículas virales libres no modificó su infectividad (Feng *et al.*, 2013).

En nuestro estudio, por el contrario, el tratamiento con tritón X-100 del virus extracelular, favorece una mayor infectividad de las células, ya que a diferencia del VHA, rotavirus requiere la activación con tripsina para la infección, y el tratamiento con tritón X-100 favorece esto.

Recientemente se ha reportado que la separación en un gradiente de densidad de iodixanol de sobrenadantes de células MA104 infectadas con rotavirus, muestra una fracción de las partículas virales extracelulares que flota. Este mismo experimento pero tratando previamente los sobrenadantes con tritón X-100, mostró que la fracción de virus que flota desaparece, lo cual sugiere que las partículas virales se encuentran asociadas a estructuras lipídicas de baja densidad (Trejo-Cerro *et al.*, 2018). Estos resultados respaldan los obtenidos en el presente trabajo, ya que aunque se trata de un experimento diferente, detectan la presencia de virus asociado a estructuras membranosas.

Por otra parte, Trejo-Cerro y colaboradores también reportan el tratamiento con jasplakinólido (fármaco que estabiliza el citoesqueleto de actina), retarda la detección de virus en el medio celular, sin afectar su asociación a estructuras lipídicas, manifestando que la salida temprana del virus, es dependiente del citoesqueleto de actina (Trejo-Cerro *et al.*, 2018), el cual también se reporta participando en los procesos de biogénesis y secreción de VEs (Bonifacino y Glick, 2004; Sinha *et al.*, 2016), por lo que las estructuras lipídicas a las cuales se asocia el virus pudieran tratarse de VEs. Respaldando esta teoría se ha visto que la replicación de rotavirus, induce un aumento progresivo de las concentraciones de calcio intracitoplasmático, el cual es un factor determinante en la regulación del citoesqueleto de actina (Brunet *et al.*, 2000), desencadena directamente la liberación de microvesículas (Hess *et al.*, 1999) y aumenta la secreción de exosomas en K562 (línea celular de eritroleucemia), células oligodendrogiales, células dendríticas y mastocitos (Colombo *et al.*, 2014).

8.3 El virus extracelular se asocia mayormente a estructuras membranosas que sedimentan a altas velocidades de centrifugación

Para caracterizar las estructuras membranosas a las que está asociado el virus extracelular, se empleó un protocolo que enriquece diferentes subpoblaciones de VEs en función de sus tamaños. Los procedimientos de aislamiento de VEs son muy variados; incluyen centrifugación diferencial, flotación en gradientes de densidad, cromatografía de separación por tamaño, precipitación con PEG, inmunoprecipitación y el uso de kits comerciales que se basan en parte en estos métodos. Estas técnicas permiten separar y concentrar las poblaciones de VEs, con diferentes tasas de éxito, de ahí que se recomienda combinar múltiples procedimientos de aislamiento para separar claramente las subpoblaciones de vesículas en función de su tamaño, densidad y/o composición (van Niel *et al.*, 2018).

Los experimentos se realizaron a partir del medio de cultivo de células MA104 infectadas cosechado a las 10 hpi, donde ya se determinó el mayor porcentaje de virus liberado protegido a tripsina, previo a la lisis celular. Este sobrenadante se procesó inicialmente por centrifugación diferencial, permitiendo separar las vesículas más grandes por centrifugaciones sucesivas a velocidades crecientes. El sobrenadante se separó en tres fracciones, que según el protocolo están enriquecidas en una población de vesículas en particular. La fracción 1 (F1) corresponde al *pellet* obtenido con centrifugación a 2000 g y contiene vesículas de gran tamaño (por ejemplo: grandes cuerpos apoptóticos). En la fracción 2 (F2) se concentran vesículas >200 nm (por ejemplo: microvesículas derivadas de membrana plasmática), mediante una centrifugación a 10 000 g, y en la fracción 3 (F3) por precipitación con PEG seguida de dos centrifugaciones (primero 10 000 g y luego 120 000 g) se enriquecieron vesículas pequeñas (por ejemplo: exosomas, y microvesículas o cuerpos apoptóticos pequeños). Las tres fracciones de VEs se analizaron para determinar la cantidad de partículas virales infectivas libres (accesible directamente a tripsina) y la cantidad de partículas virales infectivas asociadas a la subpoblación de vesículas enriquecidas en cada fracción (se necesita solubilizar membrana con tritón X-100 para ser susceptibles a tripsina) (figura 5).

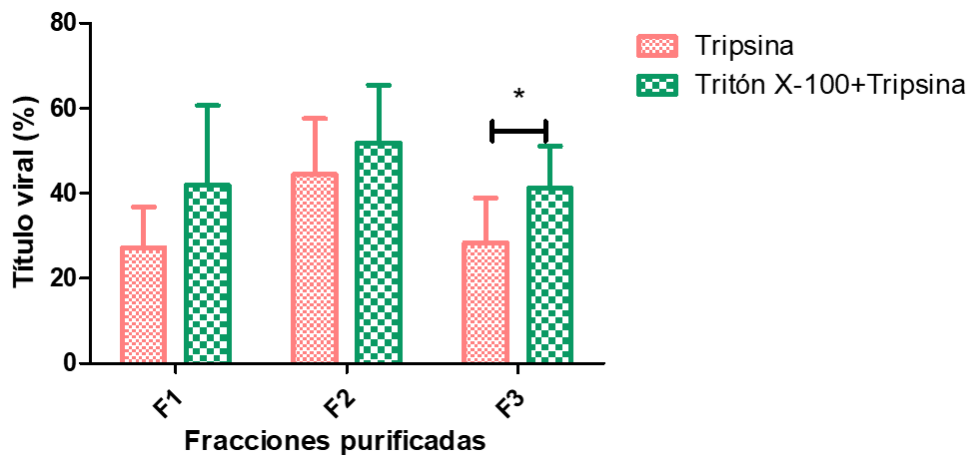


Figura 5 Ensayo de protección para cada fracción de VEs purificada. Las células se infectaron con RRV (MOI= 5) y se incubaron a 37°C hasta las 10 hpi. Se cosechó el medio celular y se llevó a cabo el protocolo de purificación de VEs descrito en materiales y métodos. Cada fracción se analizó por ensayo de protección y se determinó el título viral por ensayo de formación de focos. Los datos se expresan como porcentajes de virus infectivo en cada fracción purificada. Las barras representan el error estándar de la media de cinco ensayos independientes (n=5).

Los resultados obtenidos muestran la presencia de virus protegido por membrana en las tres fracciones de vesículas purificadas, pero el ensayo de protección mostró diferencias significativas sólo en la F3, donde están enriquecidos exosomas y otras vesículas pequeñas (menores de 200 nm aproximadamente). El 32 % del virus presente en esta fracción está protegido al tratamiento con tripsina, sugiriendo su asociación con vesículas pequeñas enriquecidas en la F3.

Aunque en la F1 y la F2 no son significativas las diferencias obtenidas por el ensayo de protección, se muestra que una parte del virus está protegido a tripsina, que en estas fracciones pueden ser por su asociación a microvesículas o cuerpos apoptóticos grandes.

El método de centrifugación diferencial permite sedimentar las vesículas intactas, sin la creación artificial de pequeñas vesículas a partir de vesículas más grandes, que pueden interferir con la interpretación de los resultados. Diferentes variantes de este método de purificación se utilizan en la actualidad y pueden implicar ultracentrifugación de mayor velocidad, por ejemplo de 140 000 g (Baietti *et al.*, 2012) o incluyen diferentes pasos antes de la ultracentrifugación final, como la filtración para eliminar residuos y vesículas de más de 220 nm (Théry *et al.*, 2006). Separar las diferentes poblaciones de VEs es un reto, porque en ocasiones pueden sedimentar a velocidades de centrifugación similares. Los exosomas sedimentan entre 100 000 -

200 000 g y flotan en un gradiente de sacarosa entre 1.10 - 1.19 g/ml (Barreto *et al.*, 2010; Théry *et al.*, 2006). Las microvesículas sedimentan entre 10 000 – 20 000 g y flotan a densidad de 1.16 g/ml aproximadamente (Cocucci *et al.*, 2009); y los cuerpos apoptóticos sedimentan entre 1200 – 100 000 g y flotan a densidades >1.24 g/ml (Théry *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta la amplia gama de gravedades a la que sedimentan los cuerpos apoptóticos, las velocidades utilizadas para purificar exosomas también pueden precipitarlos; por lo tanto, es probable que en las VEs obtenidas en la F3, se encuentren estas dos poblaciones de vesículas. Discernir entre una y otra se dificulta debido a la poca caracterización de los marcadores vesiculares. En algunos estudios se ha encontrado que los cuerpos apoptóticos tienen las mismas proteínas que los exosomas, pero con histonas o proteína 14-3-3 como característica distintiva (Gutwein *et al.*, 2005; Théry *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2009).

La presencia de cuerpos apoptóticos en las fracciones concentradas a 100 000 g que también contienen exosomas, no depende del protocolo utilizado para su depuración, ya que se han identificado en diferentes protocolos usados (Barreto *et al.*, 2010; Bautista *et al.*, 2015). Además, considerando que rotavirus induce apoptosis en etapas tempranas de la infección en células MA104, paralelo a la rápida pérdida de la viabilidad y la actividad metabólica celular (Halasz *et al.*, 2010), sugerimos que en el presente estudio existe la probabilidad de que cuerpos apoptóticos pequeños puedan encontrarse en la F3 junto con exosomas.

En el 2015 se realizaron estudios de VEs liberadas durante la infección de células Caco-2 por rotavirus, con un protocolo de centrifugación diferencial similar al empleado en este trabajo, donde inicialmente se realizó una centrifugación a 4 000 g para evaluar la presencia de cuerpos apoptóticos grandes, luego 10 000 g para microvesículas y por último 100 000 g para el análisis de exosomas y cuerpos apoptóticos pequeños. Los resultados de estos experimentos mostraron la presencia de múltiples tipos de vesículas difíciles de caracterizar con precisión, pero que se centran en exosomas y cuerpos apoptóticos. Estos últimos se encontraron en el *pellet* de 100 000 g y también distribuidos en todo un gradiente de densidad de sacarosa al igual que la proteína VP6 de rotavirus, sugiriendo que los virus liberados están asociados a cuerpos apoptóticos distribuidos en todo el gradiente (Bautista *et al.*, 2015).

Por otra parte, el egreso de virus independiente de gemación de la membrana plasmática, puede mediarse por mecanismos involucrados en la ruta de biogénesis de exosomas, y asociarse a estos durante su liberación y en el medio extracelular. La vía exosomal para la liberación de virus se ha identificado en VHA, VHE y recientemente se determinó poliomavirus JC también asociado a vesículas que sedimentan a 100 000 g y que presentan marcadores de exosomas (Morris-Love *et al.*, 2019). También se ha encontrado que tanto los norovirus humanos como los murinos, parecen explotar la vía de formación de MVEs para liberarse en las heces, dentro de exosomas (Santiana *et al.*, 2018).

Para reafirmar la protección del virus a tripsina en la F3, volúmenes iguales de esta fracción se trataron con tritón X-100 (0.05 ó 0.1 %) y luego activado con tripsina o solo activado con tripsina o con medio de cultivo (MEM). En cada condición se determinó la presencia de la proteína viral VP4 procesada o sin procesar por cortes proteolíticos con tripsina, usando el anticuerpo monoclonal HS2 que reconoce la subunidad VP5* (derivada de VP4 procesada por corte con tripsina) (figura 6).

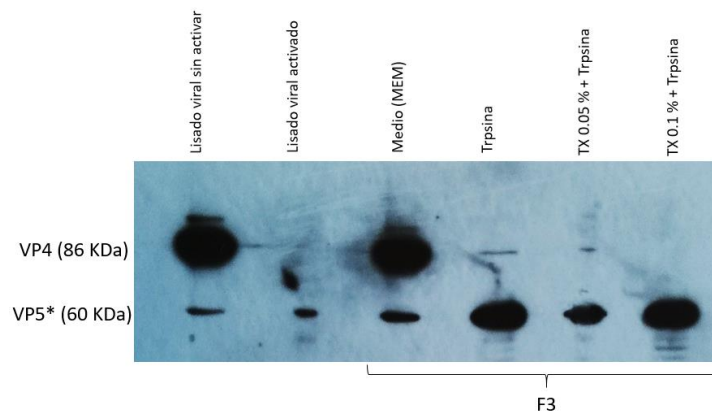


Figura 6 La proteína VP4 del virus, no es totalmente procesada por tripsina en la F3. Las células MA104 se infectaron con RRV (MOI=5) y se incubaron a 37°C hasta las 10 hpi que se cosechó el medio de cultivo. Se realizó la purificación de la F3 y volúmenes iguales de la misma, se trataron con tripsina, tritón X-100 0.05 % + tripsina o tritón X-100 0.1 % + tripsina o sólo con medio (MEM). Se determinó con el anticuerpo monoclonal HS2 la subunidad VP5* procesada o formando parte de la proteína VP4 sin procesar con tripsina. TX: tritón X-100.

Los resultados muestran una banda bien marcada de VP4 cuando se trata con MEM, donde la proteína no es procesada. Aún se observa una banda visible de VP4 sin procesar cuando se trata solo con tripsina, sugiriendo que una parte de la proteína

está protegida de cortes por tripsina. La banda se hace muy tenue cuando se trata con tritón X-100 0.05 % previo al tratamiento con tripsina, y desaparece totalmente cuando se usa antes tritón X-100 0.1 %, ya que esta concentración solubiliza totalmente las membranas lipídicas a las cuales se encuentra asociado el virus, y la enzima procesa toda la proteína VP4 de las partículas virales libres (figura 6). Estos resultados avalan los resultados obtenidos por ensayo de protección en la F3 (figura 5).

En vesículas conteniendo rotavirus se demostró que el virus puede estar protegido de degradarse por la exposición prolongada a proteasas presentes en las heces y del reconocimiento por anticuerpos mucosales, en las heces o en el intestino de nuevos hospederos (Mantis *et al.*, 2011). De hecho, la ausencia de reconocimiento por los anticuerpos, puede ser una de las razones por las cuales la infección parece ser más persistente con los rotavirus encerrados en vesículas (Santiana *et al.*, 2018).

8.4 Determinación de marcadores que caracterizan la población de vesículas enriquecidas en la F3

Actualmente la obtención de subpoblaciones de VEs puras resulta un gran desafío, debido a sus propiedades biofísicas, ya que aún no están completamente definidas sus características y pueden superponerse en tamaño y densidad (Théry *et al.*, 2009). Esto hace empíricamente imposible lograr preparaciones de VEs puras, sumando a este problema el costo y elevado tiempo de manejo requerido para el enriquecimiento y la purificación de las vesículas, especialmente para los experimentos de proteómica que requieren concentrar grandes volúmenes de medios para extraer la proteína vesicular. Varios métodos analíticos están disponibles y deben combinarse para primero evaluar la pureza, integridad y concentración de las VEs. Los enfoques de uso común para el análisis de la composición y morfología de las poblaciones de VEs incluyen: análisis por western blot, rastreo de nanopartículas, MET y citometría de flujo, complementado con análisis de proteómica, lipidómica y/o secuenciación de ARN / ADN (Coumans *et al.*, 2017; Mateescu *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta que la F3 está enriquecida en vesículas pequeñas, buscamos la presencia de proteínas reportadas como marcadores exosómicos, que es la subpoblación que se espera que esté enriquecida en esta fracción. Para determinar si el proceso de purificación permitió enriquecer de manera eficiente esta población de

vesículas, se evaluaron los requisitos mínimos que permiten afirmarlo: presencia de tres proteínas marcadoras de exosomas y un marcador de pureza, o sea una proteína que no se espera en los exosomas purificados. Aunque numerosos análisis proteómicos han destacado las proteínas comúnmente encontradas en las preparaciones de exosomas, estos no representan marcadores específicos de exosoma, sino más bien marcadores enriquecidos en exosomas. Sin embargo, las proporciones relativas de los diferentes marcadores parecen variar de acuerdo a muchas variables (Lötvall *et al.*, 2014).

Los marcadores exosomales presentes en las fracciones, se determinaron mediante western blot con el uso de anticuerpos específicos. Se identificaron en la F3, tres de las proteínas reportadas como marcadores positivos de exosomas: CD63, Alix y Hsp70 como se esperaba, pero estas también estuvieron presentes en la F1 y la F2 (figura 7A), sugiriendo que estos marcadores parecen también estar presentes en las vesículas grandes de estas fracciones.

Para determinar la pureza de los exosomas en la F3, determinamos la ausencia de la proteína PDI, que es una proteína de membrana del RE que no está presente en exosomas. Mediante western blot se confirmó su ausencia en esta fracción, indicando la pureza de la F3 de elementos de RE (figura 7A).

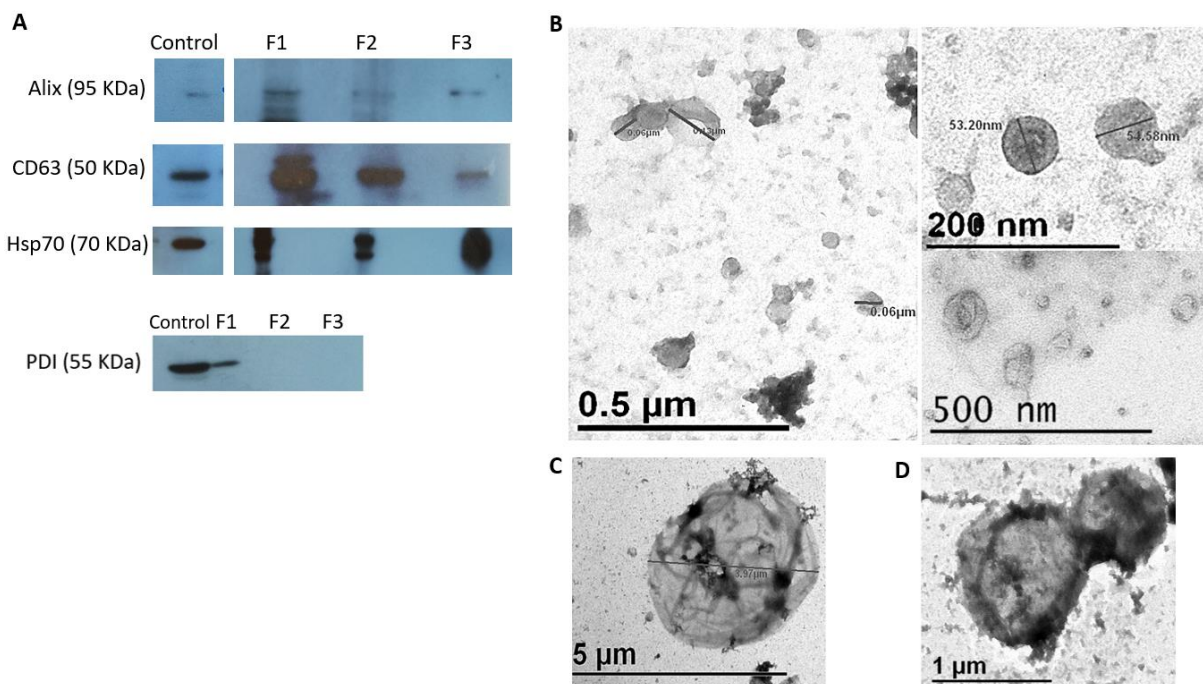


Figura 7 Caracterización de la población de vesículas enriquecidas en la F3, liberadas de células MA104 infectadas. Células MA104 se infectaron con RRV (MOI=5) y a las 10 hpi se colectó el sobrenadante y se purificaron las VEs como se describe en materiales y métodos. La presencia de

marcadores positivos de exosomas: CD63, Hsp70 y Alix, y la ausencia de PDI usada como marcador de pureza de exosomas en la F3, se determinó por western blot en las tres fracciones (A). Todas las masas proteicas aproximadas se representan en kilodaltones (kDa). Microfotografía electrónica de la F3 (B). Microfotografía electrónica de la F1 (C) y la F2 (D).

Estudios proteómicos muestran que los exosomas contienen un subconjunto específico de proteínas celulares, algunas de las cuales dependen del tipo de célula secretora, mientras que otras se encuentran en la mayoría de exosomas independientemente del tipo de célula de la que provengan. Los marcadores más comúnmente encontrados incluyen proteínas de endosomas, de la membrana plasmática y del citosol, mientras que las proteínas del núcleo, de las mitocondrias, del RE y del complejo de Golgi están en su mayoría ausentes. Estas observaciones resaltan la especificidad de formación de los exosomas y muestran que representan un compartimento subcelular específico y no una matriz aleatoria de fragmentos celulares (Théry *et al.*, 2001).

Debido a su función en la biogénesis de exosomas las proteínas Alix y TSG101, son marcadores de exosomas derivados de varios tipos celulares. Alix se relaciona a la biogénesis de exosomas en reticulocitos, donde se propuso su unión al dominio citoplásmico del receptor de transferrina para competir con la unión a Hsc70 y promover la clasificación del receptor en las ILVs (Géminard *et al.*, 2004). Luego se demostró que la sobreexpresión de sintenina induce un aumento en la liberación de exosomas, dependiente de Alix, que se evidencia por un aumento de los marcadores exosomales: CD63 y Hsp70 (Baietti *et al.*, 2012).

CD63 está particularmente enriquecida en la superficie de exosomas y está involucrada en la clasificación endosomal en melanocitos (van Niel *et al.*, 2011) y en la biogénesis de exosomas en fibroblastos (Gauthier *et al.*, 2017). En células infectadas con EBV, CD63 es fundamental para dirigir a las ILVs la proteína LMP1 (*latent membrane protein 1*), codificada por el virus, y permitir su posterior salida en exosomas (Verweij *et al.*, 2011). Esta proteína es catalogada como uno de los mejores marcadores de exosomas, aunque en nuestro estudio, a pesar de estar presente en la F3 donde se esperaba, se muestra abundante también en la F1 y la F2. Existen reportes que manifiestan que CD63 también se asocia a cuerpos apoptóticos, a partir de una disminución de su detección luego del tratamiento con inhibidores de caspasas (Bautista *et al.*, 2015) y además, se ha descrito su asociación con cuerpos apoptóticos

grandes, así como microvesículas y exosomas por citometría de flujo (Crescitelli *et al.*, 2013). Esto podría explicar su presencia en la F1 y la F2 donde se encuentran cuerpos apoptóticos grandes (figura 7C) y microvesículas (figura 7D).

Otros marcadores tanto de exosomas, como de pureza de exosomas, son empleados. La caracterización del proteoma de exosomas derivados de hepatocitos muestra el enriquecimiento de numerosos marcadores proteicos tales como: integrina $\beta 1$, CD81, ICAM-1 y MFG-E8 entre otros; mientras que la presencia de marcadores de pureza, específicos de otros compartimentos subcelulares como Grp78 de RE, Pmp70 de peroxisoma o Prohibitin1 y mtPmp70 de mitocondria, fue indetectable en las preparaciones de exosomas, lo que significa que la contaminación con material derivado de estos compartimentos, fue mínima (Conde-Vancells *et al.*, 2008).

Por otra parte se ha visto que la apoptosis temprana genera vesículas pequeñas a partir de la membrana plasmática (cuerpos apoptóticos pequeños o micropartículas) (Poon *et al.*, 2014; Wickman *et al.*, 2013), las cuales se diferencian de los cuerpos apoptóticos tardíos porque estos exponen sobre su superficie material derivado de sistemas internos de membrana, como el RE (Franz *et al.*, 2007). En células Caco-2 se reportó que la infección con rotavirus, aumenta la liberación de VEs que al concentrarse a 100 000 g están compuestas por exosomas mezclados con cuerpos apoptóticos posiblemente derivados de etapas tempranas de apoptosis, ya que no se observó la presencia de calnexina (marcador de RE) (Barreto *et al.*, 2010). En nuestro trabajo tampoco detectamos el marcador de RE, proteína PDI, en la F3 purificada a 120 000 g, lo cual además de demostrar la pureza de la población enriquecida de exosomas, sugiere que las pequeñas vesículas purificadas en la F3, podrían ser una mezcla de exosomas y cuerpos apoptóticos pequeños derivados de apoptosis temprana de las células MA104 (Halasz *et al.*, 2010).

Como técnica complementaria a la detección de proteínas exosomales por western blot, las vesículas purificadas de la F3 se analizaron por MET (figura 7B), y se observaron solo vesículas entre 50-200 nm de diámetro aproximadamente, que muestran la forma típica de copa, descrita para exosomas fijados observados por MET mediante tinción negativa (Choi y Mun, 2017). Debido a que los exosomas caen por debajo del umbral de resolución de la microscopía óptica, la MET ha sido hasta ahora la técnica más usada para la observación directa del tamaño y la morfología de los exosomas (Raposo *et al.*, 1996). Recientemente se encontró poliomavirus JC

asociado a vesículas que sedimentan a 100 000 g y que presentan marcadores de exosomas; su asociación se confirmó también por MET, observando vesículas entre 150-200 nm marcadas con CD81, con virus en su interior o asociado por la membrana externa (Morris-Love *et al.*, 2019).

8.5 La infección viral aumenta la liberación de vesículas en células MA104

Se realizó una comparación semi-cuantitativa de la secreción de VEs en células infectadas y no infectadas, para determinar las diferencias en cuanto a la presencia de marcadores de exosomas (figura 8).

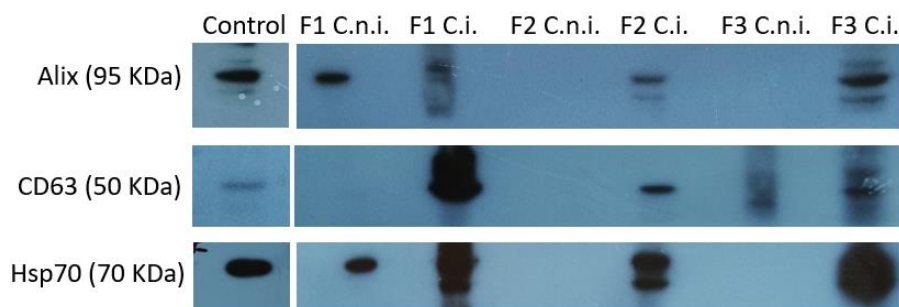


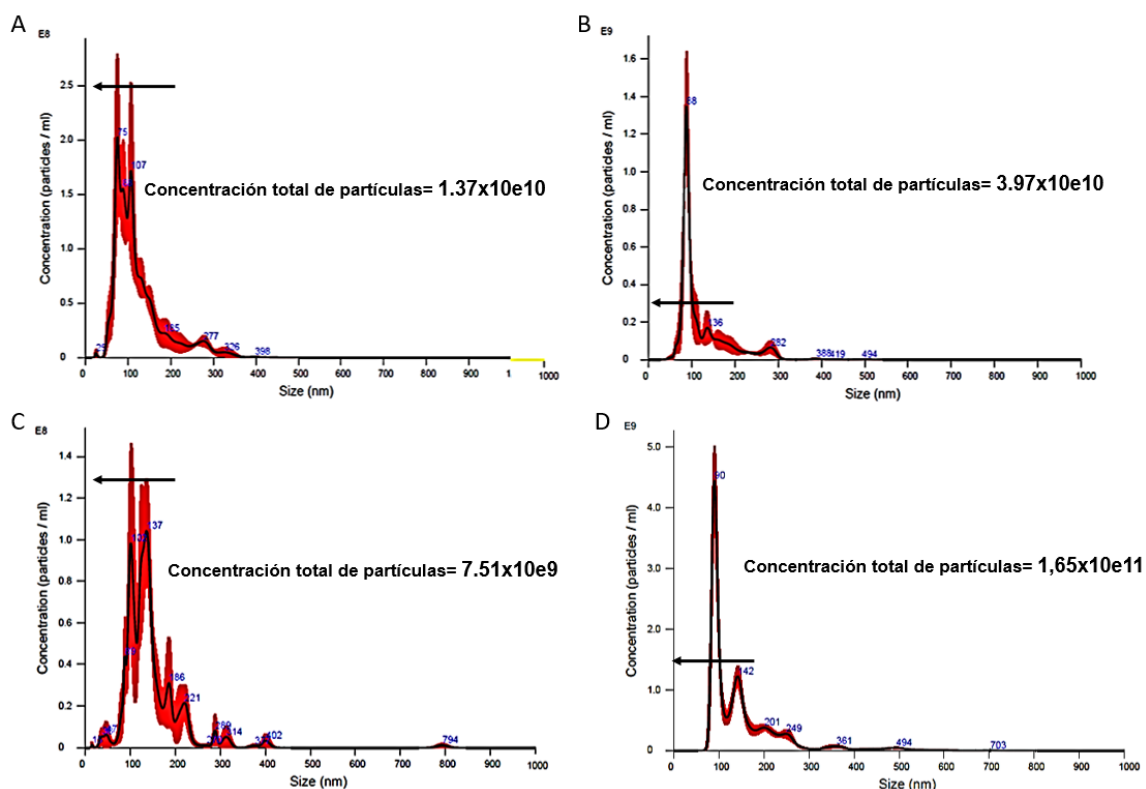
Figura 8 Determinación de marcadores de exosomas, en VEs liberadas de células MA104 infectadas (C.i.) y no infectadas (C.n.i.). Las células MA104 se infectaron con RRV (MOI=5) o no infectadas y a las 10 hpi se cosechó el sobrenadante y se purificaron las tres fracciones (F1, F2 y F3). Se determinó por western blot la presencia de los marcadores: Alix, CD63 y Hsp70. Las masas proteicas aproximadas se representan en kilodaltons (kDa).

Los resultados muestran la presencia de los marcadores CD63, Alix y Hsp70 en las tres fracciones purificadas del sobrenadante de las células infectadas. Mientras que en las células MA104 no infectadas, los marcadores Alix y Hsp70 se detectan solo en la F1 y CD63 en la F3, lo cual al parecer esta dado porque las células MA104 en condiciones normales, producen un nivel bajo de vesículas, no permitiendo una buena detección de las proteínas. Estos resultados sugieren que la infección con RRV condiciona a la célula a una mayor producción de VEs que contienen estos marcadores.

En correspondencia al resultado obtenido en este estudio, también se observó en células Caco-2, que la infección con rotavirus aumentó la expresión de Hsc70, AChE y CD63 en las VEs distribuidas en todo el gradiente de densidad de sacarosa (Bautista *et al.*, 2015). La secreción de exosomas puede ser espontánea o inducida dependiendo del tipo de célula. Los reticulocitos, células T y B y mastocitos en reposo, secretan niveles detectables de exosomas sólo después de la activación de un receptor de superficie celular. Por el contrario, el efecto de la infección de EBV sobre

células B, células dendríticas y macrófagos provoca la secreción constitutiva de exosomas *in vitro* (Dinh *et al.*, 2016). Las infecciones virales pueden aumentar la liberación de vesículas al medio extracelular, por ejemplo los oncogenes E6 / E7 del virus del papiloma en células HeLa (células de cáncer cervical humano), inducen la liberación de microvesículas con miembros de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (Honegger *et al.*, 2013) y en células tumorales se ha detectado una mayor producción de ciertas vesículas debido a un aumento en la transcripción de secuencias retrovíricas endógenas (Balaj *et al.*, 2011). Además el cambio de medio con suero fetal bovino a medio libre de suero, necesario para evitar la co-purificación de exosomas del suero presente en el medio, con los exosomas derivados de las células, es un estímulo que desencadena o modifica la secreción de exosomas, ya que induce un estrés en las células que probablemente produce alteraciones cuantitativas y/o cualitativas en la secreción de VEs (Colombo *et al.*, 2014).

Para respaldar los resultados anteriores obtenidos por western blot, se determinó la concentración de VEs por análisis de trayectoria de nanopartículas, comparando la concentración de vesículas producidas por células infectadas y no infectadas (figura 9).



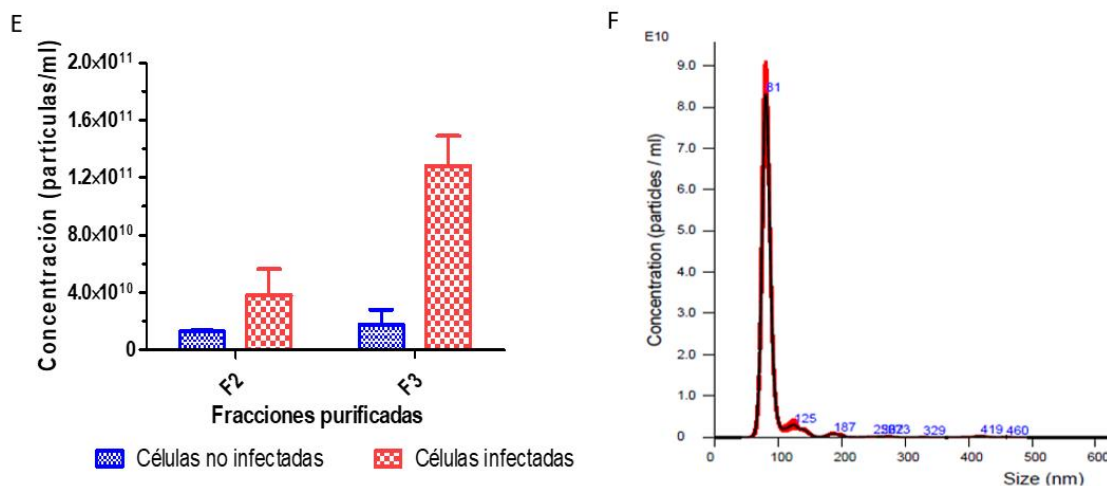


Figura 9 Determinación de la concentración de vesículas en el sobrenadante de células infectadas y no infectadas. Células MA104 fueron infectadas con RRV (MOI=5) o no infectadas y a las 10 hpi se cosechó el sobrenadante y se purificaron las fracciones (F2 y F3). Se realizó un análisis de la concentración de partículas por mililitro en células infectadas y no infectadas, usando un equipo de nanosight NS300. Gráficos correspondientes a la F2 de células no infectadas (A) e infectadas (B). Gráficos correspondientes a la F3 de células no infectadas (C) e infectadas (D). Concentración de partículas/ml en la F2 y la F3 de células infectadas y no infectadas (E). Control de TLPs puras que muestra su tamaño en nm calculado por el equipo (F). Los resultados son a partir de dos experimentos biológicos, cada uno con cinco lecturas.

El análisis de trayectoria de nanopartículas por este equipo, es una técnica de dimensionamiento rápida, conveniente en el contexto de caracterización. Este equipo no permite la lectura de partículas de más de 1 μm por lo que solo se analizaron la F2 y la F3 teniendo en cuenta que las lecturas del equipo van desde 50-1000 nm, que son los tamaños de partículas determinados en estas fracciones. La lectura del nanosight de las TLPs purificadas (figura 11F), muestra un tamaño de partícula viral libre de 81 nm aproximadamente, la cual se usa como control para el análisis de los tamaños correspondientes a vesículas extracelulares o a virus asociados a vesículas en la F2 y la F3.

Las figuras 9 A y B corresponde a la F2 de células no infectadas e infectadas, respectivamente. La figura 9 A muestra un patrón de vesículas más heterogéneo en cuanto a tamaños, con una concentración de 1.37×10^{10} partículas/ml, mientras que en la figura 9 B, se observa un pico fino que corresponde a las partículas virales libres, mientras que el resto de los picos representan vesículas grandes y partículas virales asociadas a estas.

Las figuras 9 C y D representan la F3 de células no infectadas e infectadas, respectivamente. En la figura 9C, similar a lo descrito anteriormente en la figura 9A, las vesículas poseen tamaños más variados que los observados en el gráfico de la F3 de células infectadas (figura 9D) con una concentración de 7.51×10^9 partículas/ml, mientras que en la figura 9D se observa un pico fino que corresponde a las partículas virales libres y el resto de los picos representan vesículas con tamaños superiores a los del virus libre y/o partículas virales asociadas a vesículas.

En la figura 9E, se calcularon las concentraciones de partículas por mililitro (correspondiente a vesículas y virus asociado a vesículas) en cada fracción purificada y se observó que en la F3, hay una diferencia de casi un logaritmo entre la concentración de partículas por mililitro secretadas de células infectadas respecto a las no infectadas. Para poder comparar la concentración de partículas producidas por células no infectadas y células infectadas sin que interfiera la concentración de partículas virales libres también presentes en el purificado, se empleó el tamaño control de TLPs purificadas (figura 9F) de aproximadamente 81 nm, valor correspondiente a la moda del experimento, que es el más usado para describir una muestra. Este equipo no discrimina entre VEs y partículas virales, de ahí que en las fracciones purificadas de sobrenadantes de células infectadas, se determinó que el 10 % aproximadamente de la concentración total de partículas, corresponde al tamaño identificado para las TLPs purificadas, lo que sugiere que pertenece a las partículas virales libres. El 90 % (representado por los picos por debajo de las flechas negras en las figuras 9B y 9D) de la concentración total dada por el experimento, corresponde entonces a vesículas y a virus asociado a vesículas. Siguiendo este análisis, se comparó la concentración total de partículas por mililitro en las fracciones derivadas de las células no infectadas (representado por los picos por debajo de las flechas negras en las figuras 9A y 9C), con el 90 % de la concentración total de partículas por mililitro, en las fracciones purificadas de células infectadas, observándose cerca de un logaritmo más en la concentración de partículas, que representan vesículas pequeñas, de la F3 purificada de las células infectadas respecto a las no infectadas. A pesar de que en la F2 también se observa un incremento en las vesículas liberadas debido a la infección, este es menos marcado (figura 9E). Esto sugiere que la infección por el virus promueve la liberación de VEs, mayormente de vesículas pequeñas concentradas en la F3.

El análisis de trayectoria de nanopartículas se realiza mediante un dispositivo diseñado para medir distribución de tamaño y concentración de nanopartículas (Dragovic *et al.*, 2011), siguiendo el movimiento de partículas individuales en suspensión iluminadas con láser, bajo movimiento browniano y luego calcula su diámetro utilizando métodos estadísticos. Este método tiene la ventaja de ser una forma rápida y sencilla de analizar un gran número de partículas a la vez, donde las señales de dispersión de las partículas individuales dentro del campo de visión son rastreadas y grabadas en videos. Una evaluación precisa del perfil de tamaño requiere el rastreo de tramos largos, a temperatura y viscosidad constante y una dilución adecuada de las muestras, parámetros que se tuvieron en cuenta para la medición en el presente estudio (Soo *et al.*, 2012).

En estudios realizados en células Caco-2 infectadas con RRV, se mostró la liberación de proteínas asociadas con vesículas, las cuales son liberadas en mayor cantidad por células infectadas que por células no infectadas, mostrando además que las vesículas liberadas de células infectadas tenían mayor función inmunomoduladora que las de células no infectadas (Barreto *et al.*, 2010). En el presente estudio la detección de proteínas marcadoras de exosomas y la diferencia en cuanto a la concentración de partículas por mililitro observadas en células infectadas respecto a las no infectadas, sugiere que la infección por rotavirus estimula la secreción de vesículas. Una mayor producción de estas vesículas por las células infectadas, podría relacionarse a un fenómeno de patogénesis viral, pues la infección puede, además de inducir una mayor liberación de vesículas, cambiar el contenido exosomal de lípidos, miARN y/o proteínas, modificando así la comunicación intercelular (Wurdinger *et al.*, 2012) o por el contrario, a un mecanismo de respuesta celular para lidiar con la infección viral.

8.6 Tratamientos químicos de inhibición y estimulación de la secreción de exosomas, ejercen efecto sobre la asociación de partículas virales con VEs

Para determinar cómo influye la inhibición o estimulación de los procesos de biogénesis de exosomas sobre la asociación de virus infeccioso con VEs liberadas de células MA104, estas se incubaron con los reactivos y se analizaron los sobrenadantes en cada caso. Para inhibir la secreción de exosomas se empleó el GW4869, que inhibe la actividad de la esfingomielinasa neutra, la cual participa en la síntesis de ceramidas presentes en la membrana de los exosomas. Para estimular la secreción de exosomas se usó la bafilomicina A1, que inhibe la actividad de la H⁺ -

ATPasa vacuolar, evitando la acidificación del endosoma y su maduración a lisosomas, por lo que se favorece la vía de formación de los MVEs que siguen la ruta exocítica, se fusionan con la membrana plasmática y liberan los exosomas al medio. El otro compuesto químico usado es el NH_4Cl , que es una base débil que evita la acidificación del endosoma favoreciendo también la ruta exocítica de los MVEs.

La liberación de proteínas totales al medio extracelular a partir de células MA104 infectadas o no infectadas, se determinó a partir de los sobrenadantes cosechados de cada tratamiento (figura 10), con el fin de determinar cómo afectan estos tratamientos la liberación de proteínas al medio, ya sean vesiculares o virales.

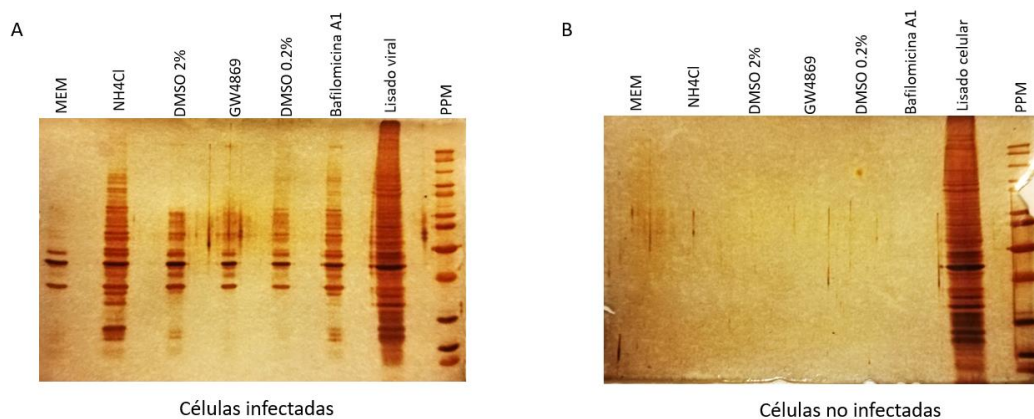


Figura 10 Los tratamientos químicos de inhibición o estimulación de la biogénesis de exosomas en células MA104, se asocian a la liberación de menor o mayor cantidad de proteínas totales respectivamente. Las células MA104 se infectaron con RRV (MOI = 5) y se incubaron con diferentes reactivos inhibidores o estimuladores de la biogénesis de exosomas, entre las 4 – 10 hpi a 37°C. Posteriormente se cosechó el sobrenadante de cada tratamiento, y usando el mismo volumen (12 μl) en cada caso, se determinó por tinción de plata la cantidad de proteínas totales en el medio extracelular de células infectadas (A) y no infectadas (B).

Los resultados revelan que las células infectadas, independientemente del tratamiento químico empleado, muestran nuevamente una mayor cantidad de proteínas en el medio, que las células no infectadas, donde no se detectaron proteínas (figura 10B). El tratamiento con bafilomicina A1 respecto a su control (DMSO 0.2%) y el tratamiento con NH_4Cl respecto a su control (MEM), aumentan la liberación de proteínas totales (proteínas celulares y/o virales) en el medio extracelular, tal como se ha esperado. Mientras que el tratamiento con GW4869 respecto a su control (DMSO 2%), muestra una ligera disminución de proteína total en el medio (figura 10A).

Para determinar que los tratamientos empleados no afectan la integridad celular, se comprobó la liberación de LDH en los sobrenadantes de cada tratamiento químico, tanto de células infectadas como no infectadas (figura 11). Los porcentajes de LDH observados en el medio extracelular muestran que no existe una afectación de la integridad celular provocada por la presencia de los compuestos químicos en el medio.

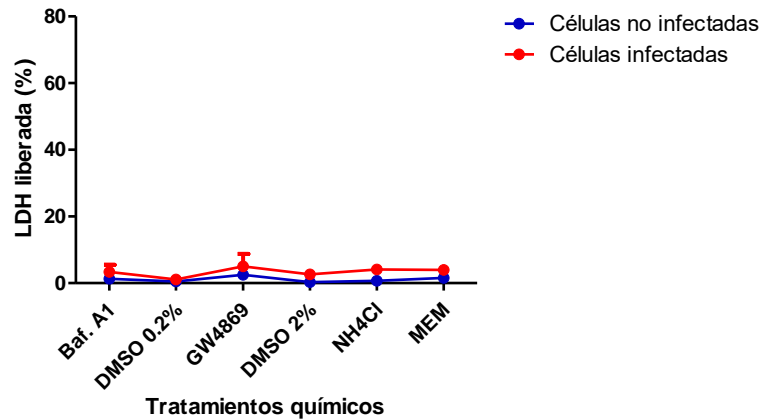


Figura 11 Los tratamientos químicos no afectan la integridad celular de células MA104. Células MA104 se infectaron con RRV (MOI = 5) y se incubaron con reactivos inhibidores o estimuladores de la ruta de biogénesis de exosomas, entre las 4 y 10 hpi a 37°C. Posteriormente se cosechó el sobrenadante de cada tratamiento, y se determinó la LDH liberada al medio. Los datos representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3) y son expresados como porcentaje de LDH liberada al medio en cada tratamiento químico. Los datos se compararon con un control realizado en MA104 no infectadas tratadas con los diferentes reactivos.

Para conocer los efectos de inhibir y estimular la secreción de exosomas sobre la asociación de virus infeccioso con VEs en el medio, las células MA104 infectadas se incubaron con los tratamientos químicos a las 4 hpi, teniendo en cuenta que a este tiempo las partículas virales se están ensamblando dentro de la célula, evitando que el efecto de los reactivos interfiera en mecanismos de entrada y/o replicación viral, ya que no es el objetivo de este estudio e interferiría en los resultados. Por ejemplo se ha visto que la pre-incubación de las monocapas de células MA104 30 minutos antes de la infección, con NH₄Cl 30 mM, redujo el número de focos infecciosos en aproximadamente el 50 % ya que afecta la entrada viral (Kaljot *et al.*, 1988). A pesar de ello, se comprobó que no se afectara algún paso de ensamble de la partícula viral, mediante la titulación de las monocapas infectadas, mostrando que los tratamientos químicos empleados no afectan la formación de las nuevas partículas virales, por lo tanto los cambios que se determinan en el virus extracelular no se deben a esto, sino a eventos de salida del virus (figura 12 B).

Para determinar si los tratamientos químicos inciden sobre la fracción de virus protegido a tripsina liberado en el sobrenadante, se realizaron ensayos de protección para cada tratamiento químico empleado (figura 12 A).

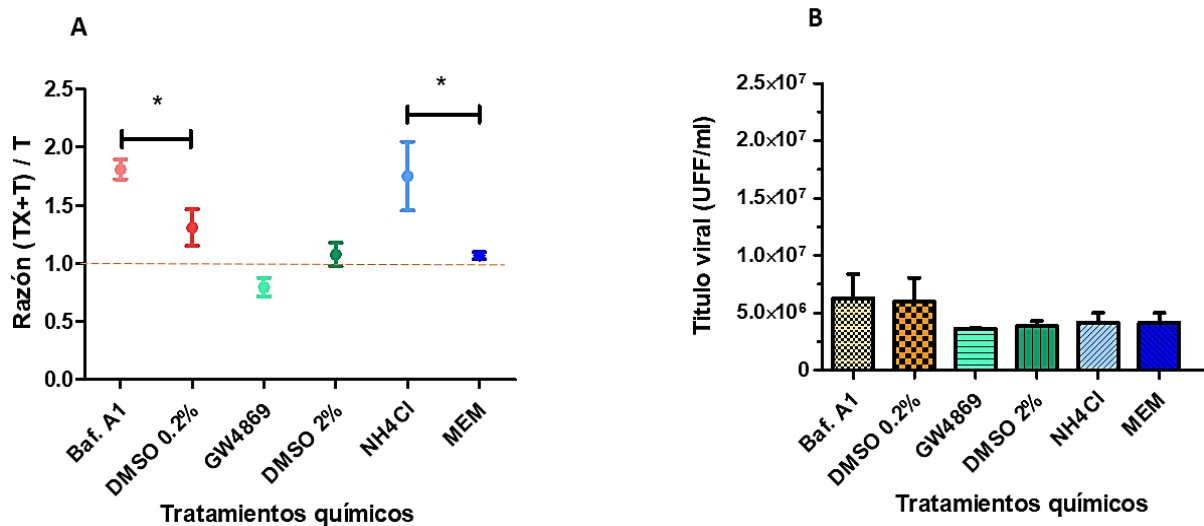


Figura 12 Los tratamientos químicos que estimulan e inhiben la secreción de exosomas, se relacionan con la mayor o menor presencia de virus protegido a tripsina en el sobrenadante de células MA104 infectadas. Células MA104 se infectaron con RRV (MOI=5) y a las 4 hpi se cambió el medio, por un químico inhibidor o estimulador de la secreción de exosomas y seis horas después se cosechó el sobrenadante o la monocapa de células. En los sobrenadantes cosechados, para cada tratamiento y su control se realizó ensayo de protección y se tituló el virus por ensayo de formación de focos. Los datos se expresan como la razón de los títulos de virus tratados con tritón X-100 + tripsina, dividido entre los títulos de virus tratados solo con tripsina [(TX+T) / (T)]. Por encima de la línea roja punteada se representa la parte de virus protegido a tripsina (A). Se determinó el título de virus de las monocapas celulares en cada tratamiento y su control, por ensayo de formación de focos (B). Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3).

De manera general, los títulos virales en los sobrenadantes son relativamente bajos (orden de 10⁵ UFF/ml), debido a que el sobrenadante cosechado deriva de solo seis horas de infección, desde las 4 hpi, cuando las células infectadas se incuban con el químico, hasta las 10 hpi que se cosecha el sobrenadante, ya que como observamos anteriormente (figura 3B) después de las 10 hpi se detecta el inicio de la lisis celular debido a la infección viral. Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos con los dos estimuladores de la biogénesis de exosomas: bafilomicina A1 respecto a su control (DMSO 0.2 %) y NH₄Cl respecto a su control (MEM), aumentan la fracción de virus protegido en 0.5 veces en ambos casos, mientras que el tratamiento con GW4869 la disminuye, aunque no de manera significativa.

El NH₄Cl es una base débil que neutraliza el pH de las vesículas ácidas intracelulares y reduce la acidificación de los endosomas, evitando que maduren a lisosomas y por

tanto los MVEs formados se fusionan con la membrana plasmática y liberan los exosomas al medio extracelular. La participación del NH_4Cl en la regulación del pH, puede causar la alcalinización intracelular y la acidosis metabólica, lo que afecta la actividad enzimática e influye en diferentes procesos biológicos. Se ha usado como inhibidor de la autofagia en estudios *in vitro*, donde afecta el pH de lisosomas, disminuyendo la actividad de los autolisosomas (Kawai *et al.*, 2007). La bafilomicina A1 es un reactivo inhibidor de la H^+ ATPasa vacuolar, capaz de inhibir la función lisosomal (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011), por lo que la vía de biogénesis de exosomas se ve favorecida. En células embrionarias de riñón (HEK293) la incapacidad de la actividad lisosomal mediante la inhibición de la H^+ ATPasa vacuolar, condujo a un aumento en la liberación de exosomas (Villarroya-Beltri *et al.*, 2016). En hepatocitos infectados con VHE el tratamiento con bafilomicina A1 aumentó los niveles de ARN viral en el sobrenadante de células infectadas, sugiriendo la liberación del virus por la vía exosómica (Nagashima *et al.*, 2014). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, pero aquí la bafilomicina A1 aumento específicamente la cantidad de virus infectivo protegido a tripsina, también observado al emplear el tratamiento con NH_4Cl , sugiriendo que la salida de una parte del virus se relaciona con la biogénesis de exosomas, permaneciendo asociados a estos en su forma extracelular, lo cual limita su procesamiento con tripsina.

Por otra parte, tanto la bafilomicina A1 como el NH_4Cl , se han descrito en varios estudios estimulando la apoptosis celular, lo cual podría estar aumentando también la formación de vesículas apoptóticas. Teniendo esto en cuenta, existe la probabilidad que la salida del virus se asocie a la formación de vesículas apoptóticas a las cuales permanecería unido el virus en el medio extracelular, protegiéndolo de la acción de tripsina. Por ejemplo en neuronas corticales primarias cultivadas de ratas recién nacidas, el tratamiento con NH_4Cl promovió la aparición de muerte celular por apoptosis, a través de un mecanismo que inhibe una cinasa de supervivencia (Klejman *et al.*, 2005). Además, en un estudio realizado en células HeLa, el tratamiento con NH_4Cl aumentó la tasa de apoptosis celular y favoreció la activación de la caspasa-3, y un aumento del daño al ADN de estas células (Xu *et al.*, 2013). La bafilomicina A1, en células de cáncer de páncreas, inhibió el crecimiento de estas células a través de mecanismos apoptóticos (Ohta *et al.*, 1998) y en células de cáncer de colon suprimió la macroautofagia, previendo la acidificación de lisosomas, lo cual induce apoptosis

por la disminución de la transición de G1 a S y el inicio de la escisión de caspasas 3, 7, 8 y 9 (Wu *et al.*, 2009).

El GW4869 inhibe la esfingomielinasa neutra que hidroliza esfingomielina a ceramida, permitiendo la generación de subdominios de membrana que imponen una curvatura negativa espontánea en la membrana, provocando la formación de las ILVs, por lo que la ausencia de este lípido disminuye la producción de exosomas (Goni y Alonso; 2009). Nuestros resultados con este tratamiento, muestran una ligera disminución de la fracción de virus protegido pero que no resulta significativa, lo cual puede sugerir dos cosas: que la membrana de los exosomas a los cuales puede estar asociado el virus no está enriquecida en ceramidas, por lo cual no la requieren, o que el virus extracelular se asocia a otras VEs y no se ve afectado cuando se inhibe la biogénesis de exosomas por esta vía. Por ejemplo, se ha visto que en las células de melanoma humano el agotamiento de la esfingomielinasa neutra no perjudica la biogénesis de MVEs, en su lugar, un mecanismo dependiente de CD63 participa en la formación de ILVs (van Niel *et al.*, 2011). Por otro lado, similar a los resultados del presente estudio, en células MA104 infectadas con la cepa SA11 de rotavirus, la salida del virus no fue afectada por este tratamiento (Santiana *et al.*, 2018), aunque ellos sugieren que el virus no se libera por la vía exosomal, contrario a lo que sugieren otros experimentos de nuestro trabajo, tales como los tratamientos con NH₄Cl y bafilomicina A1, que promueven la liberación de una mayor cantidad de proteínas en el sobrenadante, así como un mayor número de virus protegido al tratamiento con tripsina.

A diferencia de los resultados obtenidos en el presente estudio, los niveles de ARN de VHE en el sobrenadante de células infectadas, disminuyeron significativamente al tratarse con GW4869, indicando la salida del virus por la vía exosomal (Nagashima *et al.*, 2011). En oligodendrocitos la liberación de exosomas ocurre por una vía independiente del ESCRT y dependiente de ceramida, donde la esfingomielinasa neutra en los MVEs es necesaria para la formación de ILVs (Trajkovic *et al.*, 2008), por lo que una reducción de la secreción de proteínas exosomales clásicas (CD63, CD81 o TSG101) y miARNs, también se observó al tratar células HEK293 con GW4869 (Kosaka *et al.*, 2010). En células primarias sin embargo, el tratamiento con GW4869 induce muerte celular, lo que impide el análisis confiable de la secreción de exosomas o puede aumentar la liberación de vesículas de todos los tamaños, cuando se usa en una concentración que no induce muerte (Colombo *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta que la detección de proteínas exosomales en sobrenadante se dificulta debido a su baja concentración, el tratamiento con NH_4Cl se realizó en formato de frascos de 150 cm^2 , tanto en células infectadas como no infectadas, para purificar las tres fracciones y determinar si la presencia de las proteínas virales y de los marcadores de exosomas se ven afectados en la F3 (figura 13 A), o también en las F1 y F2 (figura 13 B).

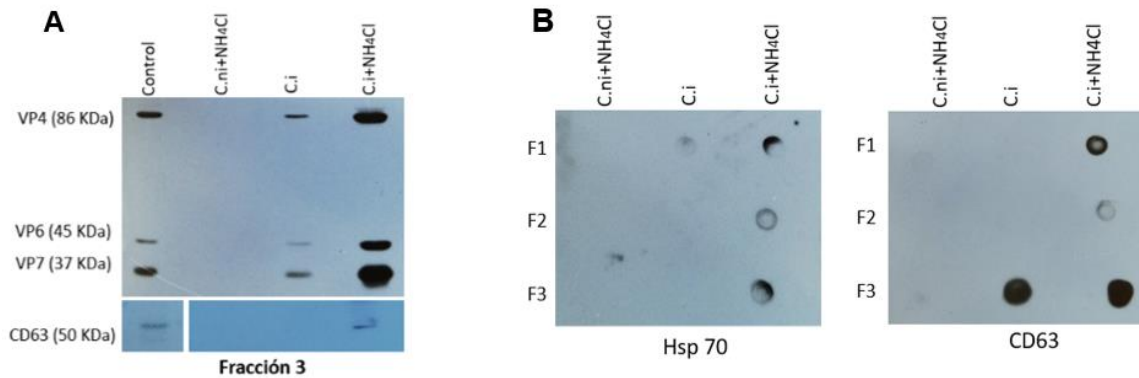


Figura 13 Los tratamientos con NH_4Cl de células MA104 infectadas con RRV aumentan la cantidad de proteínas virales y marcadores de exosomas, en el sobrenadante purificado. Los sobrenadantes de células MA104 crecidas en frascos de 150 cm^2 se compararon según tres condiciones diferentes: células no infectadas tratadas con NH_4Cl (C.ni+ NH_4Cl), células infectadas con RRV (MOI = 5) tratadas con NH_4Cl (C.i+ NH_4Cl) y células infectadas sin tratar (C.i). De los sobrenadantes se purificaron las tres fracciones de VEs. Se determinó por western blot la presencia de proteínas virales y CD63 en la F3 para cada condición, usando volúmenes iguales en cada caso (A) y por dot blot se determinó la presencia de CD63 y Hsp70 para cada condición, en las tres fracciones purificadas (B).

El western blot de la F3 muestra una mayor detección de proteínas virales cuando las células infectadas se tratan con NH_4Cl . De igual manera, el marcador exosomal CD63 solamente fue detectado en esta misma condición (figura 13 A).

Por otra parte, la determinación por dot blot de la presencia de CD63 y Hsp70 en las diferentes condiciones descritas, también muestran que el tratamiento con NH_4Cl en células infectadas, aumenta la presencia de ambos marcadores, al parecer en las tres fracciones, sugiriendo en este caso que el tratamiento también estimula la liberación de otras VEs, como pueden ser los cuerpos apoptóticos, presentes en la F1 y la F2 (figura 13 B).

Experimentos realizados por Jourdan y colaboradores en células Caco-2 infectadas con RRV, muestran que el tratamiento con NH_4Cl 50 mM, no afecta la cantidad de virus ni en la monocapa, ni en el sobrenadante, por lo que plantean que las partículas del virus no transitan a través del compartimento lisosomal (Jourdan *et al.*, 1997). En

nuestro estudio, tampoco el tratamiento afectó el virus presente en la monocapa celular, pero si modificó la presencia de virus en el medio celular, aumentando específicamente la cantidad de virus protegido a tripsina, lo cual no fue evaluado en el estudio de Jourdan y colaboradores (Jourdan *et al.*, 1997).

Otro estudio, también en células Caco-2 infectadas, el uso de inhibidores de caspasas disminuyó inesperadamente la presencia de los marcadores exosomales Hsc70 y AChE en las vesículas enriquecidas a 100 000 g y en vesículas separadas por gradiente de densidad de sacarosa con densidades bajas y altas (1.10-1.32 g/ml), sugiriendo la presencia de cuerpos apoptóticos en ambos casos (Bautista *et al.*, 2015). Algo similar podría estar pasando en nuestro estudio con el tratamiento con NH₄Cl, el cual además de promover la secreción de exosomas, se reporta que promueve la apoptosis, lo cual puede explicar que se aumente la presencia de Hsp70 y CD63 en las tres fracciones que derivan del sobrenadante de células MA104 infectadas tratadas con NH₄Cl.

8.7 Análisis por MET muestra la asociación del virus a VEs

Para determinar si existe asociación del virus a las VEs, ya sea que partículas virales estén presentes en su interior ó asociándose a la membrana por fuera, se enriquecieron las VEs por centrifugación diferencial del sobrenadante de células MA104 infectadas y las diferentes fracciones se purificaron con el kit “MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS”, que purifica vesículas mediante proteínas acopladas a perlas magnéticas, que unen fosfatidilserina. Después las fracciones se observaron por MET mostrando la presencia de virus en cada fracción, tanto partículas libres como en las asociadas a las VEs purificadas (figura 14). Las partículas virales libres, al parecer también se eluyen con el kit o por manipulación de la muestra, y se desprenden de las vesículas a las que se asocian. Los tamaños de vesículas enriquecidas en cada fracción corresponden a los reportados. En la F1 se encuentran vesículas grandes con tamaños superiores a un micrómetro (figura 14-1), que pudieran corresponder a cuerpos apoptóticos grandes, cuyos tamaños reportados van de 50 nm - 5 µm (El Andaloussi *et al.*, 2013), por lo que se infiere que cuerpos apoptóticos más pequeños, también pueden estar distribuidos en la F2 y la F3.

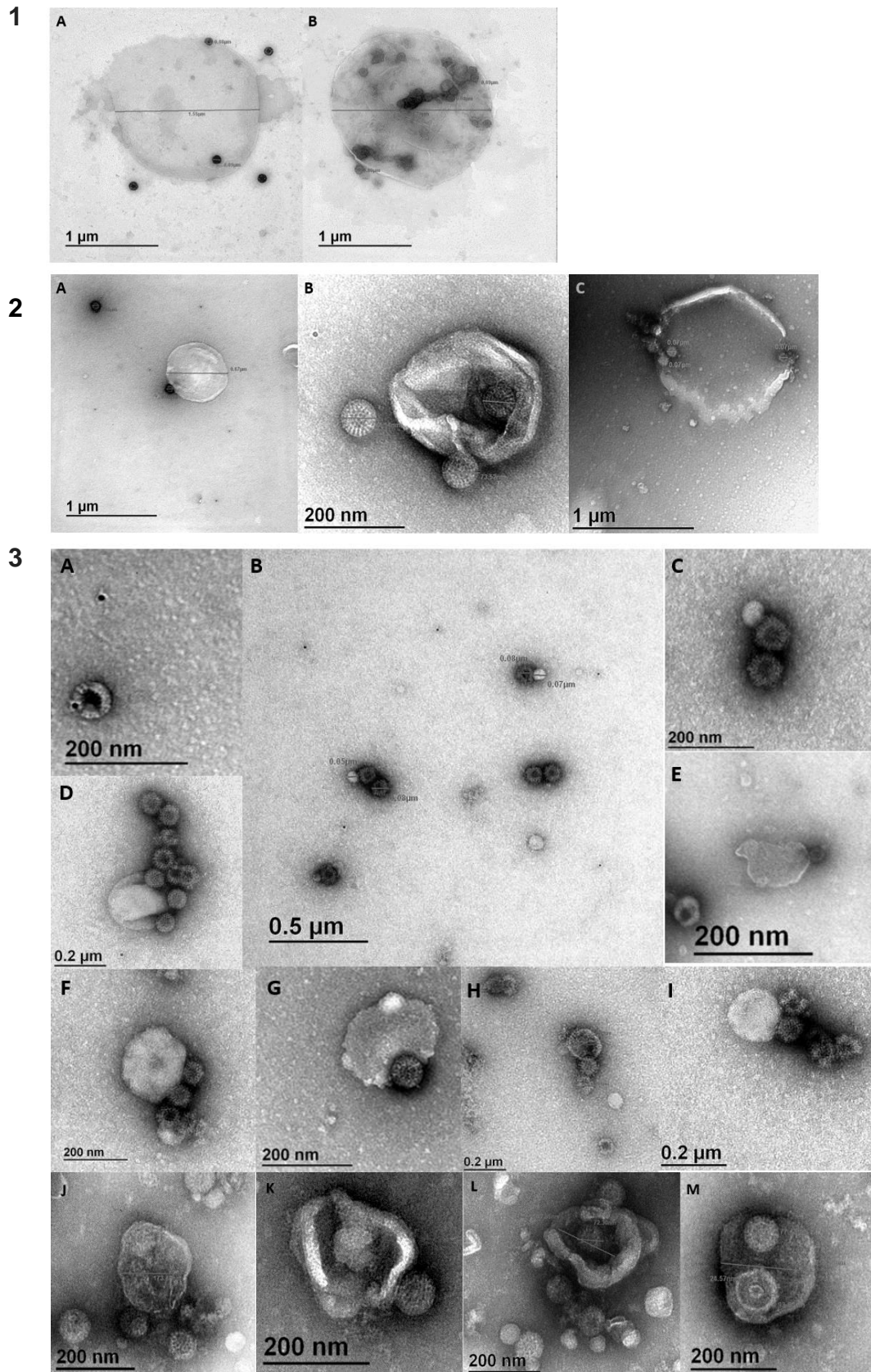


Figura 14 Microscopía electrónica de VEs de las tres fracciones purificadas. Células MA104 se infectaron con RRV (MOI=5) y su sobrenadante se cosechó a las 10 hpi para purificar las VEs por centrifugación diferencial, seguida de purificación con el kit “MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS”. Cada fracción purificada se procesó posteriormente para su observación por MET. F1 (*pellet* de la

centrifugación a 2000 g) muestra la presencia de partículas virales libres y de grandes vesículas correspondiente posiblemente a cuerpos apoptóticos, a los cuales se asocia el virus interna y externamente (1). F2 (*pellet* de la centrifugación a 10 000 g) muestra la presencia de partículas virales libres y microvesículas entre 200-1000 nm aproximadamente, con virus dentro o asociados a la membrana externa de las microvesículas (2). F3 (*pellet* de la centrifugación a 120 000 g) muestra la presencia de partículas virales libres y vesículas entre 50–200 nm a las cuales el virus se asocia por la membrana externa en grupos de dos o más virus y también se observan virus dentro de vesículas. En la imagen A se muestra la partícula de RRV libre marcada con anticuerpo acoplado a oro (3).

En la F2 se muestran vesículas aproximadamente entre 200 nm y 1 μ m de diámetro (figura 14-2), coincidente con tamaños de 100-1000 nm reportados para las microvesículas derivadas de membrana plasmática (György *et al.*, 2011); y en la F3 el diámetro de las vesículas oscila de 50–200 nm (figura 14-3), cercano a los rangos de tamaños reportados para exosomas que es de 30-150 nm aproximadamente (Colombo *et al.*, 2013), aunque pudiera ser que en esta fracción también estén presentes cuerpos apoptóticos pequeños.

Las partículas virales pueden estar dentro de las vesículas grandes purificadas en la F1 y F2, y también en las vesículas pequeñas sedimentadas en la F3. Además se asocian a las membranas externas de las vesículas de las tres fracciones (figura 14).

En la F3 se muestran vesículas conteniendo virus en su interior (figura 14-3 L y M), tal y como se ha reportado para VHA y VHE, las cuales se observaron dentro de vesículas con aproximadamente 50 nm de diámetro (Feng *et al.*, 2013; Nagashima *et al.*, 2011). Recientemente por MET se observó poliomavirus JC contenidos dentro o asociados a la membrana externa de vesículas purificadas a 100 000 g, similares a las asociaciones observadas en la figura 14–3, con tamaños de 100-300 nm y presencia de marcadores de exosomas (Morris-Love *et al.*, 2019). En el presente estudio al tratarse de virus más grandes, estos se encuentran en la F3 dentro de vesículas de más de 150 nm (figura 14-3L, 3M). Se observa además que las partículas virales también se asocian a la membrana externa de las vesículas en grupos de dos o más (figura 14-3B a la 3K). Otros estudios usando diferentes protocolos de purificación, obtuvieron poblaciones de VEs enriquecidas en exosomas (expresan CD63, Hsc70, MFG-E8 y AChE) cuya caracterización morfológica por MET mostró una población heterogénea de vesículas pequeñas, algunas con forma típica de copa reportada para exosomas (van Niel *et al.*, 2001), mezcladas con otras vesículas de forma irregular, que sugieren cuerpos apoptóticos pequeños (Barreto *et al.*, 2010).

Trabajos anteriores en nuestro laboratorio por Trejo-Cerro y colaboradores determinaron que parece existir una asociación específica de la cepa RRV de rotavirus con VEs en el medio celular. Además se observó por MET la presencia de virus asociado a lo que parecieran ser estructuras membranosas en el interior celular. Estas se encontraban muy próximas a la membrana plasmática y lejanas a los viroplasmata, apuntando que pudieran fungir como un medio de liberación del virus (Trejo-Cerro *et al.*, 2018). Santiana y colaboradores reportan a las 12 hpi de células MA104 infectadas con rotavirus, la formación de protrusiones en la superficie celular conteniendo la cápside del virus, lo que pudiera ser una de las posibles maneras en la que se libera asociado a estas vesículas. La purificación del sobrenadante de estas mismas células infectadas mediante centrifugación diferencial, seguida por *pull-down* con anexina V acoplada a perlas magnéticas que unen fosfatidilserina, mostró la mayoría del virus en el purificado de las 10 000 g y se observaron por MET virus dentro de estas vesículas grandes purificadas, similar a lo observado en la figura 14-2C, aunque Santiana y colaboradores no observaron en su purificado de exosomas presencia de virus asociado a vesículas (Santiana *et al.*, 2018). Las diferencias de resultados puede deberse al uso de otra cepa de rotavirus.

Las partículas virales independientes se han aceptado a lo largo del tiempo como unidades infecciosas óptimas para la transmisión viral, aunque recientes hallazgos desafían este punto de vista, mostrando que virus cubiertos de vesículas son unidades altamente virulentas de transmisión fecal-oral, ya que aumentan la MOI del virus en los sitios de destino (Santiana *et al.*, 2018). En primer lugar, la progenie viral al final de un ciclo de infección, en particular para virus de ARN cuyas polimerasas carecen de mecanismos de corrección, rara vez son copias idénticas de la otra (cuasiespecies) (Andino y Domingo, 2015); esto implica que muy pocos miembros de la progenie pueden llevar a cabo un ciclo de replicación exitoso en el próximo anfitrión, ya que la mayoría tienen mutaciones atenuantes. En segundo lugar, los enterovirus, incluyendo poliovirus, Coxsackievirus y todos los rinovirus, se transmiten *in vitro* como agrupaciones virales dentro de VEs (Altan-Bonnet, 2016; Chen *et al.*, 2015; Bird *et al.*, 2014; Robinson *et al.*, 2014), que una vez internalizadas permiten la liberación de copias múltiples de genomas virales simultáneamente, en el citosol de la célula hospedera; o sea que la agrupación de virus en vesículas (Chen *et al.*, 2015) o en la superficie de las bacterias, o incluso como partículas libres, pero inoculado en altas

concentraciones, pueden producir un aumento rápido en los niveles de proteína de replicación viral, así como aumentar su probabilidad de participar en cooperativas y complementarias interacciones entre ellos (compartir genomas o maquinaria de replicación). De hecho, en tales casos *in vitro*, se ha observado una mayor tasa de recombinación y una mayor diversidad genética (Bordería *et al.*, 2015; Erickson *et al.*, 2018).

En el presente estudio la asociación externa de virus a vesículas, determinada por MET en las tres fracciones, se asemeja a un mecanismo en el cual las bacterias intestinales actúan como andamios para exponer múltiples poliovirus a células susceptibles (Erickson *et al.*, 2018). Por otro lado, las partículas individuales del virus de la estomatitis vesicular pueden agregarse espontáneamente en unidades infecciosas multiviriónicas, lo cual permite que diferentes variantes genéticas virales se transmitan conjuntamente a la misma célula diana. Además la unión virión-virión puede determinar aspectos clave de la aptitud viral, como el escape de anticuerpos (Cuevas *et al.*, 2017).

En nuestro estudio la estrategia propuesta es que una asociación del virus a vesículas, puede ser un modo de aumentar el número de partículas virales que entran a la célula como se ha descrito anteriormente para otros virus. El aumento del título viral por el tratamiento con tritón X-100 previo a la activación del virus, podría contradecir esta posibilidad; sin embargo estos son experimentos *in vitro* sobre una superficie limitante, por lo que el tratamiento con tritón X-100 permite aumentar el número de sitios accesibles al corte con tripsina y consecuente activación del virus, para su posterior entrada. En el contexto *in vivo* probablemente la eliminación de las vesículas que protegen al virus, podría tener connotaciones en el reconocimiento del virus por el sistema inmune y/o en el aclaramiento del virus en el tracto gastrointestinal.

8.8 Análisis de inmunofluorescencias muestran colocalización de proteínas virales con marcadores de exosomas dentro de las células infectadas

Para determinar si existe una asociación intracelular entre las proteínas virales y marcadores exosomales, se infectaron células MA104 y seis horas después de la infección se marcaron proteínas exosomales y virales con anticuerpos fluorescentes y se analizó la colocalización entre estas, usando un microscopio confocal (figura 15).

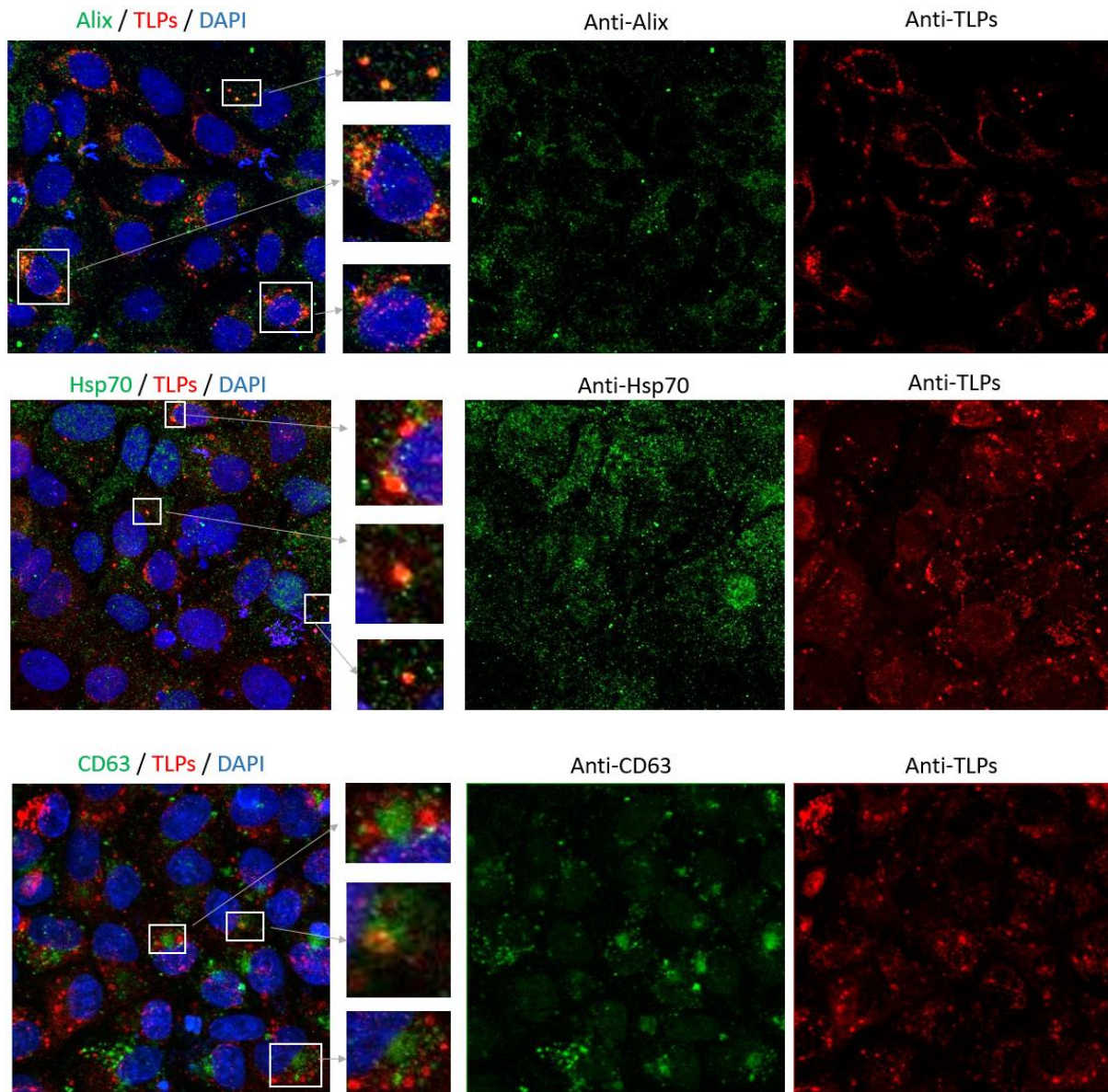


Figura 15 Colocalización de proteínas exosomales con proteínas virales en células MA104 infectadas. Las células MA104 se infectaron con RRV (MOI=5) durante seis horas. Luego se fijaron y marcaron, usando anticuerpos primarios contra Hsp70, Alix, CD63 y TLPs. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul), las proteínas de exosomas se marcaron con anticuerpo secundario de ratón asociado a Alexa-fluor 488 (verde) y las proteínas virales marcadas con anticuerpo secundario de conejo asociado a Alexa-fluor 568 (rojo). Las imágenes se observaron en un microscopio confocal a un aumento de 64X.

Los resultados observados en la microscopía muestran colocalización parcial de proteínas virales principalmente con dos de los marcadores de exosomas Hsp70 y Alix, mientras que con el marcador CD63 se vio rara vez colocalización (figura 15).

CD63 es una proteína ubicua que se localiza dentro del sistema endosomal y en la superficie celular, donde se endocita por la vía dependiente de clatrina (Pols y Klumperman, 2009). Análisis de inmunofluorescencia, en el interior de los MVEs de

hepatocitos, mostró triple colocalización de dos proteínas virales (ORF2 y ORF3) con CD63, indicando que las partículas de VHE asociadas a membranas, se liberan junto con ILVs contenidas en MVEs a través de la vía exosomal (Nagashima *et al.*, 2014). Particularmente para rotavirus varios estudios han explorado la asociación de proteínas virales con CD63, que permita su asociación a la ruta de biogénesis de exosomas. Por ejemplo en células H69 infectadas con rotavirus, no se observó colocalización entre CD63 y proteínas virales (Santiana *et al.*, 2018), pero alguna colocalización se observó en células Caco-2 infectadas, entre CD63 y la proteína VP6 de rotavirus (Barreto *et al.*, 2010).

Hsp70 y Alix son proteínas exosomales menos ubicuas que CD63, esta podría ser la razón por la que se observa una mayor colocalización en estos casos. Alix realiza una serie de funciones importantes en la vía endosomal, en la dinámica del citoesqueleto y en la brotación de virus envueltos (Fisher *et al.*, 2007). Por ejemplo la proteína Alix interactúa directamente con la proteína C del virus Sendai, lo cual juega un rol importante en la eficiente gemación del virus (Sakaguchi *et al.*, 2005) y participa en la salida celular del virus de hepatitis B a través de un mecanismo independiente del ESCRT. En células MA104 infectadas por rotavirus, el uso de ARN interferente para Alix, indicó que parece ser necesaria durante la infección celular en un paso post-entrada (Silva-Ayala *et al.*, 2013). La proteína Hsp70 es una de las principales proteínas encontradas en exosomas derivados de la mayoría de los tipos de celulares. El secuestro de proteínas citosólicas en las ILVs, pueden resultar de la clasificación conjunta con esta proteína y también se ha propuesto su secreción relacionada a *rafts* (Broquet *et al.*, 2003) e independiente de Golgi. VP4, se asocia a *rafts* tan pronto como se sintetiza, por lo que puede ser probable que siga esta ruta para orientarse a la superficie celular, ya que tampoco lo hace mediante Golgi (Delmas *et al.*, 2004). Se reporta que Hsp70 también participa en la liberación de partículas maduras de virus del zika (Pujhari *et al.*, 2019) y es inducida de manera rápida con la infección por rotavirus de células Caco-2.

Se reporta que vesículas grandes, de 0.5 μm a unos pocos micrómetros pueden ser visualizadas por microscopía de fluorescencia, aunque también utilizan la microscopía para mostrar vesículas de 100 nm o menos, exosomas o virus, pero estas observaciones no corresponden a vesículas individuales, sino a concentrados o agregados de estas (Di Vizio *et al.*, 2012). Los avances recientes de la microscopía

de super-resolución eventualmente conducirán a nuevas tecnologías para analizar tanto vesículas pequeñas como grandes, pero aún no está disponible como una herramienta de caracterización básica de VEs.

8.9 La asociación de rotavirus a VEs no protege partículas virales de la acción de anticuerpos neutralizantes

Para determinar si las VEs confieren protección al virus ante el tratamiento con anticuerpo monoclonal neutralizante e infectan las células MA104, se realizó un experimento donde las vesículas de cada fracción purificada previamente con el kit “MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS”, se sometieron a diferentes tratamientos con o sin anticuerpo neutralizante y luego se incubaron con las células (figura 16).

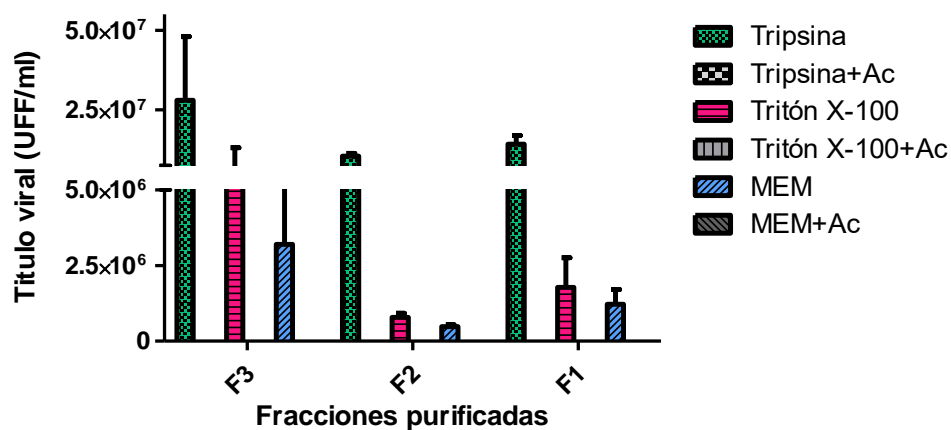


Figura 16 El virus en el medio celular asociado a VEs es neutralizado en las tres fracciones purificadas. Las células MA104 se infectaron con RRV (MOI=5) y su sobrenadante se cosechó a las 10 hpi para purificar las VEs por centrifugación diferencial, seguida de purificación con el kit. Cada fracción se trató según muestra la leyenda del gráfico y posteriormente se incubaron células MA104 durante dos horas con las diferentes fracciones tratadas. Después las células se lavaron y se dejaron infectando por 14 horas. Los títulos virales se determinaron por ensayo de formación de focos. Las barras representan el error estándar de la media de dos ensayos independientes (n=2). Ac: anticuerpo neutralizante.

Los resultados sugieren que la asociación del virus a VEs, no lo protege de la neutralización, ya que en ninguna de las fracciones donde se trató con anticuerpo neutralizante se observaron unidades formadoras de focos (las barras aunque sí están representadas en la leyenda, no están presentes en el gráfico porque su valor es cero) (figura 16). Estos resultados pudieran explicarse porque la mayoría del virus observado por MET se asocia por la parte externa de las VEs y es accesible a la acción del anticuerpo neutralizante.

Es necesario tener en cuenta dos aspectos limitantes que pudieran afectar la internalización de las vesículas: (1) la concentración de vesículas (dosis) y (2) el tiempo de incubación con las vesículas purificadas. La concentración de vesículas no se considera limitante en estos experimentos, pues se partió de sobrenadante de células infectadas provenientes de ocho F150 cm² (160 ml), que se concentraron a 60 µl en cada fracción purificada. Un estudio donde se analiza la captación de exosomas por células de cáncer de vejiga, muestra que un número de vesículas en el orden de 10⁶ es adecuado para su captura e internalización por estas células (Franzen *et al.*, 2014). Nuestros resultados anteriormente descritos, muestran por análisis de trayectoria de nanopartículas (figura 9), que la concentración de VEs en las diferentes fracciones, son del orden de 10¹⁰ partículas/ml.

El tiempo de incubación de las VEs purificadas con la monocapa de células MA104 fue de dos horas. Basado en los resultados reportados por Santiana y colaboradores en el 2018, donde una hora de incubación con vesículas conteniendo virus provenientes de heces, mostraron una infección eficiente de células MA104 (Santiana *et al.*, 2018). En otros estudios se ha visto que la captación de exosomas es mayor, según se aumentan los tiempos de incubación (Franzen *et al.*, 2014).

Por otra parte cuando se trataron las VEs de igual manera, pero sin anticuerpo neutralizante, resultados interesantes se observaron en la F3 purificada, donde el título de virus activado con tripsina se encuentra en el mismo orden de magnitud del título del virus tratado con tritón X-100, aun sin este ser activado con tripsina. Una razón pudiera ser que la cantidad de virus al que tiene acceso la tripsina para su activación y posterior penetración y replicación en las células, es similar a la cantidad de virus liberados por la solubilización con tritón X-100 de las pequeñas vesículas enriquecidas en la F3, lo cual hace que una mayor cantidad de virus se encuentren como partículas libres e infecten las células por alguna vía alternativa que no requiere la activación con tripsina. Se ha reportado que en mutantes de rotavirus parcialmente resistentes a tripsina hay un retraso en la entrada celular, aunque no se determinó diferencia notable con el virus tipo silvestre en cuanto a la replicación (Trask *et al.*, 2013). En este experimento el retraso en la entrada se vería compensado con las dos horas de incubación del virus con las células. Resultados similares a los observados en la F3 purificada, se reportan por Trejo-Cerro y colaboradores, donde ellos observan que la infectividad de rotavirus en las fracciones de baja densidad de gradiente de

iodixanol (o sea del virus asociado a estructuras lipídicas), aumentó cuando las células se trataron con tritón X-100 antes de activarse con tripsina, y este aumento en la infectividad también se observó incluso en las muestras tratadas con tritón X-100 que no fueron activadas con tripsina posteriormente (Trejo-Cerro *et al.*, 2018).

En otros virus, la acción de anticuerpos neutralizantes se evadió por la asociación del virus a vesículas y no se observó con el virus libre. Por ejemplo poblaciones de VHA envueltos, a diferencia de las partículas libres, no se neutralizan con anticuerpos neutralizantes, sugiriendo así un nuevo mecanismo de evasión del sistema inmune (Feng *et al.*, 2013). De modo contrastante, en VHE los anticuerpos sí neutralizaron las partículas de VHE dentro de vesículas, en sobrenadantes de suero y de medios de cultivo por lo que se sugiere que el virus asociado a vesículas desempeña un papel en la transmisión viral de célula a célula y no en la evasión de la neutralización por anticuerpos (Nagashima *et al.*, 2011).

En la F1 y la F2, los títulos virales de los tratamientos con tripsina sola y tripsina después de tratamiento con tritón X-100, sí muestran mayores diferencias que en la F3, o sea que el virus liberado con tritón X-100 es poco y esto concuerda con la menor asociación de virus a vesículas encontradas en estas fracciones durante su purificación (figura 5).

A pesar de que nuestros resultados muestran que las VEs a las que se asocia el virus no le permiten evadir la neutralización, otras funciones también se han descrito para las VEs liberadas por la infección con rotavirus. La purificación de las VEs mediante este kit, muestra que tanto vesículas grandes como pequeñas poseen fosfatidilserina en su membrana externa. Estos lípidos son conocidos como potentes moléculas antiinflamatorias (Birge *et al.*, 2016) que también tienen la capacidad de unirse y secuestrar citocinas antivirales tales como interferón gamma (Oyler-Yaniv *et al.*, 2017).

Además se ha reportado que los cuerpos apoptóticos de la fracción de alta densidad (> 1.24 g/ml) liberados por células Caco-2 infectadas con rotavirus, inhiben la proliferación y viabilidad de células T, así como la población heterogénea de VEs (exosomas y cuerpos apoptóticos pequeños) purificadas a 100 000 g, por lo que se especula que la infección con rotavirus puede incrementar la liberación de vesículas con propiedades inmunomoduladoras potencialmente únicas (Lane *et al.*, 2005;

Barreto *et al.*, 2010; Bautista *et al.*, 2015). Por ejemplo, en los cuerpos apoptóticos, las histonas extracelulares H3 y H4 tienen un impacto en la respuesta inflamatoria mediante la inhibición directa de la fagocitosis de las células apoptóticas y favorecen la liberación de estímulos inflamatorios asociados con necrosis secundaria (Friggeri *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta que los resultados del presente estudio, muestran que la asociación de rotavirus a VEs no inhibe la acción del anticuerpo neutralizante, se especula que pudiera relacionarse a otras funciones, por ejemplo funciones inmunomoduladoras, tal y como se demuestra en los estudios descritos anteriormente.

En resumen, los datos generados en este trabajo nos indican que la infección con rotavirus de células MA104, permite la liberación de virus en tiempos previos a la lisis celular, y que una parte del virus se asocia a VEs de diferentes tamaños en el medio extracelular, aunque principalmente a las vesículas más pequeñas, las cuales le confieren protección a tripsina, pero no a la acción de anticuerpos neutralizantes. La infección de las células estimula la liberación de VEs, que en su mayoría sedimentan a altas velocidades de centrifugación y que presentan marcadores de exosomas; aunque la presencia de estos marcadores también en fracciones del sobrenadante centrifugadas a menor velocidad, sugiere que se encuentran en vesículas de todos los tamaños, lo cual sugiere que puede tratarse de cuerpos apoptóticos. La liberación del virus asociado a vesículas al parecer se relaciona con la ruta de biogénesis de exosomas o de formación de cuerpos apoptóticos tempranos, ya que se aumenta con tratamientos estimuladores de estos eventos biológicos. Será importante seguir investigando más en detalle el mecanismo a través del cual se liberan rotavirus de las células infectadas y qué tipo de vesícula es a la que se encuentra asociado, así como la razón de ocurrencia de este evento.

9. CONCLUSIONES

- 1- Los rotavirus se liberan de células MA104 desde tiempos tempranos de la infección por mecanismos que no implican lisis celular, y una parte del virus liberado está protegido de la activación con tripsina por su asociación con vesículas extracelulares.
- 2- La infección de las células MA104 con rotavirus promueve una mayor liberación de vesículas extracelulares.
- 3- El virus se asocia mayormente a vesículas extracelulares pequeñas, con marcadores CD63, Hsp70 y Alix, que pudieran ser exosomas y/o cuerpos apoptóticos pequeños.
- 4- Los tratamientos químicos que estimulan la secreción de exosomas, aumentan la liberación de vesículas con marcadores CD63, Hsp70 y Alix, y la cantidad de virus infeccioso asociado a vesículas en el medio extracelular.
- 5- La colocalización de CD63, Hsp70 y Alix y proteínas virales en el citoplasma de células infectadas, sugiere que una parte del virus que se libera pudiera hacerlo asociado a vesículas.
- 6- La asociación del virus a vesículas no lo protege de la acción de anticuerpos neutralizantes.
- 7- El virus puede asociarse a vesículas extracelulares a través de su interacción por la parte externa de la vesícula o estar contenido en el interior de esta.

10.PERSPECTIVAS

1. Determinar mediante un análisis más profundo de las proteínas presentes en las vesículas, a que tipo o tipos de vesículas se asocia el virus.
2. Identificar si la liberación del virus está asociada a la ruta de biogénesis de exosomas y/o a la formación de cuerpos apoptóticos tempranos.
3. Identificar y caracterizar el papel de las vesículas extracelulares derivadas de células infectadas en la propagación del virus.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altan-Bonnet, N. (2016). Extracellular vesicles are the Trojan horses of viral infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 32: 77-81.
- Alvarez-Erviti, L. Yiqi, Seow. Schapira, Anthony. H. Gardiner, Chris. Sargent, Ian. L. Wood, Matthew. J.A. Cooper, J. Mark. (2011). Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol Dis.* 42(3): 360–367.
- Andino, R. Domingo, E. (2015). Viral quasispecies. *Virology.* 479-480: 46–51.
- Arnold, M. Patton, J.T. McDonald, S.M. (2009). Culturing, storage, and quantification of rotaviruses. *Curr Protoc Microbiol.* 15:3.
- Baietti, M. F. Zhang, Z. Mortier, E. Melchior, A. Degeest, G. Geeraerts, A. Ivarsson, Y. Depoortere, F. Coomans, C. Vermeiren, E. Zimmermann, P. David, G. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14:677–685.
- Balaj, L. Lessard, Ryan. Lixin, Dai. Yoon-Jae, Cho. Pomeroy, Scott. L. Breakefield, Xandra. O. Skog, Johan. (2011). Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. 2:180.
- Barreto, A. Rodríguez, L.S. Rojas, O.L. Wolf, M. Greenberg, H.B. Franco, M.A. Angel, J. (2010). Membrane vesicles released by intestinal epithelial cells infected with rotavirus inhibit T-cell function. *Viral Immunol.* 23(6):595-608.
- Bautista, D. Rodríguez, L.S. Franco, M. A. Angel, J. Barreto, A. (2015). Caco-2 cells infected with rotavirus release extracellular vesicles that express markers of apoptotic bodies and exosomes. 20:697–708
- Bird, S.W. Maynard, N.D. Covert, M.W. Kirkegaard, K. (2014). Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111:13081–13086.
- Birge, R.B. Boeltz, S. Kumar, S. Carlson, J. Wanderley, J. Calianese, D. Barcinski, M. Brekken, R.A. Huang, X. Hutchins, J.T. Freimark, B. Empig, C. Mercer, J. Schroit, A. J. Schett, G. Herrmann, M. (2016). Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ.* 2:962–978.
- Blutt, S.E. Kirkwood, C.D. Parreño, V. Warfield, K.L. Ciarlet, M. Estes, M.K. Bok, K. Bishop, R. F. Conner, M.E. (2003). Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet.* 362(9394):1445–1449.
- Blutt, S.E. Matson, D.O. Crawford, S.E. Staat, M.A. Azimi, P. Bennett, B.L. Piedra, P.A. Conner, M.E. (2007). Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med.* 4(4):121. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040121>
- Bonifacino, J.S. Glick, B.S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell.* 23;116(2):153-166.
- Bordería, A.V. Isakov, O. Moratorio, G. Henningsson, R. Aguera-Gonzalez, S. Organtini, L. Gn€adig, N.F. Blanc, H. Alcover, A. Hafenstein, S. Fontes, Magnus. Shomron, Noam. Vignuzzi, Marco. (2015). Group selection and contribution of minority variants during virus adaptation determines virus fitness and phenotype. *PLoS Pathog.* 11:1004838.
- Broquet, A. H. Thomas, G. Masliah, J. Trugnan, G. Bachelet, M. (2003). Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. *J. Biol. Chem.* 278:21601–21606.
- Brunet, J.P. Cotte-Laffitte, J. Linxe, C. Quero, A.M. Géniteau-Legendre, M. Servin, A. (2000). Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: role in microvillar actin alteration. *J Virol.* 74(5):2323-2332.
- Cevallos Porta, D. López, S. Arias, C.F. Isa, P. (2016). Polarized rotavirus entry and release from differentiated small intestinal cells. *Virology.* 499:65-71.
- Chen, Y.H. Du, W. Hagemeyer, M.C. Takvorian, P.M. Pau, C. Cali, A. Brantner, C.A. Stempinski, E.S. Connelly, P.S. Ma H.C. Jiang, P. Wimmer, E. Altan-Bonnet, G. Altan-Bonnet, N. (2015). Phosphatidylserine vesicles enable efficient en bloc transmission of enteroviruses. *Cell* 160, 619–630.
- Ciarlet, M. Conner, M.E. Finegold, M.J. Estes, M.K. (2002). Group A Rotavirus Infection and Age-Dependent Diarrheal Disease in Rats: a New Animal Model To Study the Pathophysiology of Rotavirus Infection. 76(1): 41–57.

- Clayson, E.T. Brando L.V.J., Compans, R.W. (1989). Release of simian Virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *J. Virol.* 63:2278–2288.
- Cocucci, E. Racchetti, G. Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 19:43–51.
- Colombo, M. Moita, C. van Niel, G. Kowal, J. Vigneron, J. Benaroch, P. Manel, N. Moita, L.F. Théry, C. Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* 126:5553–5565.
- Colombo, M. Raposo, G. Thery, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30:255–289.
- Conde-Vancells, J. Rodriguez-Suarez, E. Embade, N. Gil, D. Matthiesen, R. Valle, M. Elortza, F. Lu, S.C. Mato, J.M. Falcon-Perez, J.M. (2008). Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J. Proteome Res.* 7:5157–5166.
- Coulson, B.S. Londrigan, S.L. Lee, D.J. (1997). Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 94:5389–5394.
- Coumans, F. A. W. Brisson, A.R. Buzas, E.I. Dignat-George, F. Drees, E.E.E. El-Andaloussi, S. Emanuelli, C. Gasecka, A. Hendrix, A. Hill, A.F. Lacroix, R. Lee, Y. van Leeuwen, T.G. Mackman, N. Mäger, I. Nolan, J.P. van der Pol, E. (2017). Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circ. Res.* 120:1632–1648.
- Crescitelli, R. Lässer, C. Szabó, T.G. Kittel, A. Eldh, M. Dianzani, I. Buzás, E.I. Lötvall, J. (2013). Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles* 2:20677.
- Cuevas, J.M. Duran-Moreno, M. Sanjuan, R. (2017). Multi-virion infectious units arise from free viral particles in an enveloped virus. *Nat. Microbiol.* 2:170-178.
- Delmas, O. Durand-Schneider, Anne-Marie. Cohen, Jean. Colard, Odile. Trugnan, Germain. (2004). Spike Protein VP4 Assembly with Maturing Rotavirus Requires a Postendoplasmic Reticulum Event in Polarized Caco-2 Cells. *J Virol.* 78(20): 10987–10994.
- Desselberger, U. Richards, J. Tchertanov, L. Lepault, J. Lever, A. Burrone, O. Cohen, J. (2013). Further characterisation of rotavirus cores: ss(+)RNAs can be packaged in vitro but packaging lacks sequence specificity. *Virus Res.* 178:252–263.
- Dinh, H. Ningning, Y. Venkatarreddy, N. (2016). Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 6(4):287–296
- Di Vizio, D. Morello, M. Dudley, A.C. Schow, P.W. Adam, R.M. Morley, S. Mulholland, D. Rotinen, M. Hager, M.H. Insabato, L. Moses, M.A. Demichelis, F. (2012). Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease. *American Journal of Pathology* 181:1573–1584.
- Dreux, M. Garaigorta, U. Boyd, B. Décembre, E. Chung, J. Whitten-Bauer, C. Wieland, S. Chisari, F.V. (2012). Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe.* 12(4):558–570.
- El Andaloussi, S. Mäger, I. Breakefield, X.O. Wood, M.J.A. (2013). Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 12:347–357.
- Eitan, E. Suire, C. Zhang, S. Mattson, M. P. (2016). Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and release. *Ageing Res. Rev.* 32:65–74.
- Erickson, A.K. Jesudhasan, P.R. Mayer, M.J. Narbad, A. Winter, S.E. Pfeiffer, J.K. (2018). Bacteria facilitate enteric virus co-infection of mammalian cells and promote genetic recombination. *Cell Host Microbe* 23:77.
- Estes, M.K. Graham, D.Y. Gerba, C.P. Smith, E.M. (1979). Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures. *J. Virol.* 31(3):810-815.
- Estes, M.K. Greenberg, H. Knipe, D.M. Howley, P.M. (2013). *Fields virology*. 6th ed., Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, 1348-1357.
- Feng, Z. Hensley, L. McKnight, K. Hu, F. Madden, V. Ping, L. (2013). A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature.* 496:367–371.

- Fisher, R.D. Hyo-Young, Ch. Qianting, Z. Howard, R. Wesley, I. Sundquist, C. Hill, P. (2007). Structural and Biochemical Studies of ALIX/AIP1 and Its Role in Retrovirus Budding. *128(5):841-852.*
- Fleeton, M.N. Contractor, N. Leon, F. Wetzel, J.D. Dermody, T.S. Kelsall, B.L. (2004). Peyer's patch dendritic cells process viral antigen from apoptotic epithelial cells in the intestine of reovirus-infected mice. *J Exp Med. 200:235–245.*
- Franz, S. Herrmann, K. Fümrohr, B.G. Sheriff, A. Frey, B. Gaipf, U.S. Voll, R.E. Kalden, J.R. Jäck, H.M. Herrmann, M. (2007). After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes. *Cell Death Differ. 14:733–742.*
- Franzen, C.A. Simms, P. E. Adam, F. Van, H. Foreman, K.E. Kuo, P.C. Gupta, G.N. (2014). Characterization of Uptake and Internalization of Exosomes by Bladder Cancer Cells. *Biomed Res Int. 619:82-89.*
- Friggeri, A. Banerjee, S. Xie, N. Huachun, C. de Freitas, A. Zerfaoui, M. Dupont, H.. Abraham, E. Gang, L. (2012). Extracellular histones inhibit efferocytosis. *Mol Med. 18:825–833.*
- Gardet, A. Breton, M. Fontanges, P. Trugnan, G. Chwetzoff, S. (2006). Rotavirus spike protein VP4 binds to and remodels actin bundles of the epithelial brush border into actin bodies. *J. Virol. 80: 3947-3956.*
- Gauthier, S. A. Pérez-González, R. Sharma, A. Huang, F.K. Alldred, M.J. Pawlik, M. Kaur, G. Ginsberg, S.D. Neubert, T.A. Levy, E. (2017). Enhanced exosome secretion in Down syndrome brain - a protective mechanism to alleviate neuronal endosomal abnormalities. *Acta Neuropathol. Commun. 5:65.*
- Géminard, C. de Gassart, A. Blanc, L. Vidal, M. (2004). Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of Hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. *Traffic 5:181–93.*
- Guerrero, C.A., Zárate, S. Corkidi, G. López, S. Arias, C.F. (2000). Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *74(20):9362-71.*
- Goni, F. M. Alonso, A. (2009). Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. *Biochim. Biophys. Acta 1788, 169–177.*
- Gould, S. J. Raposo, G. (2013). As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles. 2: 20398.*
- Gutiérrez, M. Isa, P. Sánchez, C. Pérez, J. Espinosa, R. Arias, C.F. López, S. (2010). Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol. 84:9161–9169.*
- Gutwein, P. Stoeck, A. Riedle, S. Gast, D. Runz, S. Condon, T.P. Marmé, A. Phong, M.C. Linderkamp, O. Skorokhod, A. Altevoigt, P. (2005). Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res. 11:2492–2501.*
- György, B. Pasztoi, T.G. Pal, M.Z. Misjak, P. Aradi, B.Laszlo, V. Pallinger, E. Pap, E. Kittel, A. György, N. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci. 68:2667–2688*
- Halasz, P. Holloway, G. Coulson, B.S. (2010). Death mechanisms in epithelial cells following rotavirus infection, exposure to inactivated rotavirus or genome transfection. *J Gen Virol. 91:2007–2018.*
- Hagbom, M. Istrate, C. Engblom, D. Karlsson, T. Rodriguez-Diaz, J. Buesa, J. Taylor, J.A. Loitto, V.M. Magnusson, K.E. Ahlman, H. Lundgren, O. Svensson, L. (2011). Rotavirus stimulates release of serotonin (5 HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog. 7(7):1002115.*
- Honegger, A. Leitz, J. Bulkescher, J. Hoppe-Seyler, K. Hoppe-Seyler, F. (2013). Silencing of human papillomavirus (HPV) E6/E7 oncogene expression affects both the contents and the amounts of extracellular microvesicles released from HPV-positive cancer cells. *Int. J. Cancer. 133:1631–42.*
- Huang, F.P. Platt, N. Wykes, M. Major, J.R. Powell, T.J. Jenkins, C.D. MacPherson, G.G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med. 191:435–444.*
- Isa, P. Realpe, M. Romero, P. Lopez, S. Arias, C.F. (2004). Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology 322:370–381*
- Jahn, R. Scheller, R. H. (2006). SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7:631–643.*

- Jonesteller, C.L. Burnett, E. Yen, C. Tate, J.E. Parashar, U.D. (2017). Effectiveness of rotavirus vaccination: a systematic review of the first decade of global postlicensure data, 2006–2016. *Clin Infect Dis.* 65:840-850.
- Jourdan, N. Maurice, M. Delautier, D. (1997). Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J Virol.* 71: 8268.
- Kaljot, K. T. Shaw, R. D. Rubin, D. H. Greenberg, H.B. (1988). Infectious Rotavirus Enters Cells by Direct Cell Membrane Penetration, Not by Endocytosis. *62(4):1136-44.*
- Kawai, A. Uchiyama, H. Takano, S. Nakamura, N. Ohkuma, S. (2007). Autophagosome-lysosome fusion depends on the pH in acidic compartments in CHO cells. *Autophagy.* 3:154–157
- Kitamoto, N. Ramig, R.F. Matson, D.O. Estes, M.K. (1991). Comparative growth of different rotavirus strains in differentiated cells (MA104, HepG2, and CaCo-2). *Virology.* 184(2):729-37.
- Klejman, A. Węgrzynowicz, M. E. Szatmari, M. Mioduszevska, B. Hetman, M. Albrecht, J. (2005). Mechanisms of ammonia-induced cell death in rat cortical neurons: Roles of NMDA receptors and glutathione. *Neurochem Int.* 47(1–2):51-57.
- Kosaka, N. Iguchi, H. Yoshioka, Y. Takeshita, F. Matsuki, Y. Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.* 285:17442–52
- Kowal, J. Arras, G. Colombo, M. Jouve, M. Morath, J.P. Primdal-Bengtson, B. Dingli, F. Loew, D. Tkach, M. Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 113:968–977.
- Lane, J.D. Allan, V.J. Woodman, P.G. (2005). Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells. *J Cell Sci.* 118:4059–4071
- Lloyd, M.B. Lloyd, J.C. Gesteland, P.H. Bale, J.F. (2010). Rotavirus gastroenteritis and seizures in young children. *Pediatr Neurol.* 42(6):404–408.
- Lopez, S. Arias, C.F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 12: 271–278.
- Lynch, M. Sheih, W.J. Tatti, K. Gentsch, J.R. Ferebee-Harris, T. Jiang, B. Guarner, J. Bresee, J.S. Greenwald, M. Cullen, S. Davies, H.D. Trevens, C. Zaki, S.R. Glass, R.I. (2003). The pathology of rotavirus-associated deaths using new molecular diagnostics. *Clin. Infect. Dis.* 37:1327–1333.
- Mantis, N.J. Rol, N. Corthesy, B. (2011). Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* 4:603–611.
- Mateescu, B. Kowal, Emma. J. K. van Balkom, Bas. W. M. Bartel. Sabine. Bhattacharyya, Suvendra. N. Buzás, Edit. L. Buck, Amy. H. de Candia, Paola. Chow, Franklin. W.N. Das, Saumya. (2017). Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper. *J. Extracell. Vesicles.* 6:1286095.
- McNulty, M.S. Curran, W.L. McFerran, J.B. (1976). The morphogenesis of a cytopathic bovine rotavirus in Madin Darby bovine kidney cells. *J Gen Virol.* 33: 503-508.
- Meckes, D.G. Raab-Traub, N. (2011). Microvesicles and viral infection. *85(24):12844-54.*
- Mendez, E. Arias, C.F. Lopez, S. (1996). Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J. Virol.* 70:1218–1222.
- Morris-Love, J. Gretchen, V. Gee, A. Bethany, A. O'Hara, A. Benedetta, Assetta. A. Abigail, L. Atkinson, A. Aisling, S. Dugan, C. Sheila, A. Haley, A. Walter, J. Atwood. (2019). JC Polyomavirus Uses Extracellular Vesicles To Infect Target Cells. *MBio.* 9;10(2):00379-19. <https://doi.org/10.1128/mBio>.
- Mossel, E. C. Ramig, R.F. (2003). A lymphatic mechanism of rotavirus extraintestinal spread in the neonatal mouse. *J. Virol.* 77:12352–12356.
- Musalem, C. Espejo, R. T. (1985). Release of progeny virus from cell infected with simian rotavirus SA11. *J. Gen. Virol.* 66:2715–2724.
- Nagashima, S. Takahashi, M. Jirintai, S. Tanaka, T. Nishizawa, T. Yasuda, J. Okamoto, H. (2011). Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. *J Gen Virol.* 92:2838–2848.

- Nagashima, S. Jirintai, S. Takahashi, M. Kobayashi, T. Nishizawa, T. (2014). Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J Gen Virol.* 95:2166–75.
- Oyler-Yaniv, J. Oyler-Yaniv, A. Shakiba, M. Min, N.K. Chen, Y.H. Cheng, S.Y. Krichevsky, O. Altan-Bonnet, N. Altan-Bonnet, G. (2017). Catch and release of cytokines mediated by tumor phosphatidylserine converts transient exposure into long-lived inflammation. *Mol. Cell.* 66:635–647.
- Patton, J.T. (1990). Evidence for equimolar synthesis of double-strand RNA and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *Virus Research.* 17:199-208.
- Pegtel, D. Cosmopoulos, K. Thorley-Lawson, D. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(14): 6328–6333.
- Piccin, A. Murphy, W. G. Smith, O.P. (2007). Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 21:157–171.
- Pols, M.S. Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research.* 315(9):1584-1592.
- Poon, I.K. Lucas, C.D. Rossi, A.G. Ravichandran, K.S. (2014). Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol.* 14:166–180.
- Pujhari, S. Brustolin, M. Macias, V.M. Nissly, R.H. Nomura, M. Kuchipudi, S.V. Rasgon, J.L. (2019). Heat shock protein 70 (Hsp70) mediates Zika virus entry, replication, and egress from host cells. *Emerg Microbes Infect.* 8(1):8-16.
- Ramakrishnaiah, V. Thumann, C. Fofana, I. Habersetzer, F. Pan, Q. de Rooter, P.E. Willemsen. R. Demmers. J.A. Stalin, Raj, V. Jenster, G. Kwekkeboom, J. Tilanus, H.W. Haagmans, B.L. Baumert, T.F. van der Laan, L.J. (2013). Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:13109–13113.
- Ramig, R.F. (2007). Systemic rotavirus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 5:591–612.
- Raposo, G. Nijman, H.W. Stoorvogel, W. Liejendekker, R. Harding, C.V. Melief, C.J. Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 183:1161–72.
- Raposo, G. Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200:373–383.
- Rider, M.A. Hurwitz, S.N. Meckes, D.G. (2016). ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. *Sci Rep.* 12(6):239-278.
- Hess, C. Sadallah, S. Hefti, A. Landmann, R. Schifferli, J.A. (1999). Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J. Immunol.* 163:4564–4573.
- Robbins, P.D. Morelli, A.E. (2014). Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol.* 14:195–208.
- Robinson, S.M. Tsueng, G. Sin, J. Mangale, V. Rahawi, S. McIntyre, L.L. Williams, W. Kha, N. Cruz, C. Hancock, B.M. Nguyen, David. P. Sayen, M. Richard. Hilton, Brett. J. Doran, Kelly. S. Segall, Anca. M. (2014). Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. *PLoS Pathog.* 10:10040-45.
- Sakaguchi, T. Atsushi, K. Fumihiko, S. Yukie, S. Makoto, I. Katsuhiko, K. Yoshiyuki, N. Tetsuya, Y. (2005). AIP1/Alix Is a Binding Partner of Sendai Virus C Protein and Facilitates Virus Budding. *Virus-Cell Interactions.* 79(14):8933–8941.
- Santiana, M. Ghosh, S. Ho, B.A. Rajasekaran, V. Du, W.L. Mutsafi, Y. De Jesús-Díaz, D.A. Sosnovtsev, S.V. Levenson, E.A. Parra, G.I. Takvorian, P.M. Cali, A. Bleck, C. Vlasova, A.N. Saif, L.J. Patton, J.T. Lopalco, P. Corcelli, A. Green, K.Y. Altan-Bonnet, N. (2018). Vesicle-Cloaked Virus Clusters Are Optimal Units for Inter-organismal Viral Transmission. *Cell Host Microbe.* 8;24(2):208-220.
- Saxena, K. Blutt, S.E. Ettayebi, K. Zeng, X.L. Broughman, J.R. Crawford, S.E. Karandikar, U.C. Sastri, N.P. Conner, M.E. Opekun, A.R. Graham, D.Y. Qureshi, W. Sherman, V. Foulke-Abel, J. In, J. Kovbasnjuk, O. Zachos, N.C. Donowitz, M. Estes, M.K. (2015). Human intestinal enteroids: a new model to study human rotavirus infection, host restriction, and pathophysiology. *J Virol.* 90:43-56.
- Schorey, J. Cheng, Y. Singh, P. Smith, V. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO. Rep.* 16:24–43.

- Shane, D. Sarah, M. John, T. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol.* 10(3): 165–177.
- Silva-Ayala, D. López, T. Gutiérrez, M. Perrimon, N. López, S. Arias, C.F. (2013). Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:10270–10275.
- Silvestri, L. Taraporewala, Z. Patton, J. (2004). Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *J. Virol.* 78:7763–7774.
- Sinha, S. Hoshino, D. Hong, N.H. Kirkbride, K.C. Grega-Larson, N.E. Seiki, M. Tyska, M.J. Weaver, A.M. (2016). Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *J. Cell Biol.* 214:197–213.
- Soo, C.Y. Song, Y. Zheng, Y. Campbell, E.C. Riches, A.C. Gunn-Moore, F. Powis, S.J. (2012). Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. *Immunology.* 136(2):192–7.
- Takahashi, M. Yamada, K. Hoshino, Y. Takahashi, H. Ichiyama, K. Tanaka, T. Okamoto, H. (2008). Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch Virol.* 153:1703–1713.
- Tamai, K. Shiina, M. Tanaka, N. Nakano, T. Yamamoto, A. Kondo, Y. Kakazu, E. Inoue, J. Fukushima, K. Sano, K. Ueno, Y. Shimosegawa, T. Sugamura, K. (2012) Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway. *Virology* 422(2):377–385.
- Tate, J. Burton, A. Boschi-Pinto, C. Parashar, U. (2016). Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000–2013. *Clinical Infectious Diseases.* 62(2):96–105
- Taylor, J.A. O'Brien, J.A. Yeager, M. (1996). The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *EMBO Journal.* 15:4469-4476.
- Trajkovic, K. Hsu, C. Chiantia, S. Rajendran, L. Wenzel, D. Wieland, F. Schwille, P. Brugger, B. Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319(5867):1244–1247.
- Trask, S. Wetzel, J. Dermody, T. Patton, J. (2013). Mutations in the rotavirus spike protein VP4 reduce trypsin sensitivity but not viral spread. *J. Gen. Virol.* 94:1296–1300.
- Trejo-Cerro, O. Eichwald, C. Schraner, E.M. Silva-Ayala, D. López, S. Arias, C.F. (2018). Actin-Dependent Nonlytic Rotavirus Exit and Infectious Virus Morphogenetic Pathway in Nonpolarized Cells. *J Virol* 92:02076-17.
- Théry, C. Boussac, M. Véron, P. Ricciardi-Castagnoli, P. Raposo, G. Garin, J. Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol.* 15;166(12):7309-18.
- Théry, C. Duban, L. Segura, E. Véron, P. Lantz, O. Amigorena, S. (2002). Indirect activation of native CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol.* 3:1156–62.
- Théry, C. Ostrowski, M. Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 9(8):581–593.
- Tucker, S. P. Thornton, C. L. Wimmer, E. Compans, R. W. (1993). Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J. Virol.* 67:4274–4282.
- Urbanelli, L. Magini, A. Buratta, S. Brozzi, A. Sagini, K. Polchi, A. (2013). Signaling pathway sin exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes.* 4:152–70.
- van Niel, G. Raposo, G. Candalh, C. Boussac, M. Hershberg, R. Cerf- Bensussan, N. Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology.* 121:337–349.
- van Niel, G. Charrin, S. Simoes, S. Romao, M L Rochin. (2011). The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev. Cell.* 21:708–721.
- van Niel, G. D'Angelo, Gisela. Raposo, Graça. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 19:213–228.
- Verweij, F.J. van Eijndhoven, M.A.J. Hopmans, E.S. Vendrig, T. Wurdinger, T. Cahir-McFarland, E. Kieff, E. Geerts, D. van der Kant, R. Neefjes, J. Middeldorp, J.M. Pegtel, D.M. (2011). LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF- κ B activation. *EMBO J.* 30:2115–29.

- Villarroya-Beltri, C. Gutiérrez-Vázquez, C. Sánchez-Cabo, F. Pérez-Hernández, D. Vázquez, J. Martín-Cofreces, N. Martínez-Herrera, D.J. Pascual-Montano, A. Mittelbrunn, M. Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* 4: 2980.
- Wickman, G.R. Julian, L. Mardilovich, K. Schumacher, S. Munro, J. Rath, N. Zander, S. AL. Mieczak, A. Sumpton, D. Morrice, N. Bienvenut, W. V. Olso, M. F. (2013). Blebs produced by actin-myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. *Cell Death Differ.* 20(10):1293-305.
- Willms, E. Johansson, H.J. Mäger, I. Lee, Y. Blomberg, K.E. Sadik, M. Alaarg, A. Smith, C.I. Lehtiö, J. El Andaloussi, S. Wood, M.J. Vader, P. (2016). Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci. Rep.* 2(6): 22519.
- Wirblich, C. Bhattacharya, B. Roy, P. (2006). Nonstructural protein 3 of bluetongue virus assists virus release by recruiting ESCRT-I protein Tsg101. *J Virol.* 80:460–73.
- Wu, Y.C. Wu, W.K. Li, Y. Yu, L. Li, Z.J. Wong, C.C. Li, H.T. Sung, J.J. Cho, C.H. (2009). Inhibition of macroautophagy by bafilomycin A1 lowers proliferation and induces apoptosis in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 382(2):451–456.
- Wurdinger, T. Gatson, N.N. Balaj, L. Kaur, B. Breakefield, X.O. Pegtel, D.M. (2012). Extracellular vesicles and their convergence with viral pathways. *Adv Virol.* 7676-94.
- Vlassov, A. Magdaleno, S. Setterquist, R. Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys.* 1820:940–8.
- Votteler, J. Sundquist, W.I. (2013). Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host Microbe.* 14:232–41.
- Xie, Y. Bai, O. Yuan, J. Chibbar, R. Slattery, K. Wei, Y. Deng, Y. Xiang, J. (2009). Tumor apoptotic bodies inhibit CTL responses and antitumor immunity via membrane-bound transforming growth factor-beta1 inducing CD8+ T cell anergy and CD4+ Tr1 cell responses. *Cancer Res.* 69:7756–7766.
- Xu, W. Santini, A. Sullivan, J. (2009). HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. *Nat Immunol.* 10(9):1008–1017.
- Xu, Y. Ning, Wang. Yan, Ding. Chunyan, Wang. Yang, Yu. Shibing, Liu. Xiaojun, Wang. Zhixin, Li. (2013). Ammonium chloride enhances cisplatin cytotoxicity through DNA double-strand breaks in human cervical cancer cells. *Oncol Rep.* 30(3):1195-1200.
- Yanez, Mo. M. Siljander, P.R. Andreu, Z. Zavec, A.B. Borràs, F.E. Buzas, E.I. Buzas, K. Casal, E. Cappello, F. Carvalho, J. Colás, E. Cordeiro-da Silva, A. Fais, S. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles.* 4: 27066.
- Zárate, S. Espinosa, R. Romero, P. Méndez, E. Arias, C.F. López, S. (2000). The VP5 Domain of VP4 Can Mediate Attachment of Rotaviruses to Cells. *J Virol.* 72(2):593–599.