

TESIS

**Presentado a
LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**Como requisito parcial para obtener
el título de:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Por:
ALFONSO BARRETO PRIETO**

**PROTEINAS DE CHOQUE TÉRMICO Y VESICULAS DE MEMBRANA COMO
POSIBLES INMUNOMODULADORES PRODUCIDOS DURANTE LA INFECCION
POR ROTAVIRUS DE CELULAS EPITELIALES INTESTINALES**

**Bogotá, D.C.
Enero del 2010**

**PROTEINAS DE CHOQUE TÉRMICO Y VESICULAS DE MEMBRANA COMO
POSIBLES INMUNOMODULADORES PRODUCIDOS DURANTE LA INFECCION
POR ROTAVIRUS DE CELULAS EPITELIALES INTESTINALES**

ALFONSO BARRETO PRIETO

COMITÉ:

**Juanita Ángel MD, PhD
Directora**

**Manuel A. Franco MD, PhD
Director**

**Irene Bosch PhD
Jurado I**

**Clara Spinel PhD
Jurado II**

**Marcela Camacho MD, PhD
Jurado III**

**Martha Fontanilla PhD
Jurado IV**

**Alberto Gómez PhD
Jurado V**

**Ingrid Shuler, Biol. PhD
Decana Académica
Facultad de Ciencias**

**Manuel Antonio Franco, MD, PhD
Director de Posgrado
Facultad de Ciencias**

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCION	7
3. HIPOTESIS	9
4. OBJETIVOS	10
4.1 Objetivos Generales	10
4.2. Objetivos Específicos	10
5. JUSTIFICACION	11
6. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE	13
6.1. Rotavirus: patogénesis y ciclo viral	13
6.2. El sistema inmune de la mucosa intestinal	17
6.3. Células Caco-2 como modelo de CEI	20
6.4. Las vacunas contra el RV	23
6.5. Respuesta inmune al RV	24
6.6. PCT como reguladoras del sistema inmune	26
6.7. Asociación de PCT a virus	29
6.8. Generalidades de las VM	30
6.9. Las VM y las infecciones virales	32
6.10. VM como inmunomoduladores de la respuesta inmune y de la tolerancia oral	32
7. METODOLOGIA	34
8. RESULTADOS	41
9. DISCUSION GENERAL	
10. ARTICULOS	69
9. ANEXOS	73
10. BIBLIOGRAFIA GENERAL	74

LISTA DE ABREVIATURAS

- AChE:** Acetil colinesterasa
- AcMo:** Anticuerpo Monoclonal
- APC:** Célula Presentadora de Antígeno
- Caco-2:** Línea celular de cáncer colónico
- CD:** Células Dendríticas
- CEI:** Células Epiteliales Intestinales
- CFSE:** Diacetato de Carboxifluoresceína Suscimidil Ester
- CMSP:** Células Mononucleares de Sangre Periférica
- DLP:** Partícula viral de dos capas (“Double Layer Particles”)
- GE:** Gastroenteritis
- hpi:** Horas post-infección
- IP:** Inmunoprecipitación
- LDH:** Lactato deshidrogenasa
- LTreg:** Linfocitos T reguladores
- ME:** Microscopía Electrónica
- PBS:** Solución Buffer Fosfato
- PCT:** Proteínas de Choque Térmico
- RRV:** Cepa de RV de mono Rhesus
- RV:** Rotavirus
- SEB:** Enterotoxina B de *Staphylococcus spp*
- SDS-PAGE:** Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Sodio Doedecil Sulfato
- TER:** Resistencia trans-epitelial
- TLP:** Partícula viral de tres capas (“Three Layer Particles”)
- TW:** Transwell
- VM:** Vesículas de membrana
- WB:** Western blot

1. RESUMEN

El rotavirus (RV) es el principal agente viral causante de gastroenteritis severa en niños. En el momento existen 2 vacunas licenciadas que han sido adoptadas dentro de los programas de inmunización de muchos países, sin embargo, aún se desconocen muchos aspectos de los mecanismos inmunológicos que median la respuesta frente al virus. Uno de los hallazgos en este aspecto es el hecho que las frecuencias de linfocitos T (LT) circulantes específicos contra RV presentes en niños y adultos infectados son bajas comparadas con otras infecciones, y se ha postulado que esto podría explicar en parte la baja protección generada después de una primo-infección. El RV es un patógeno intestinal, es por esto que el ambiente altamente tolerogénico de la mucosa intestinal podría ser en parte responsable de modular la respuesta inmune frente a este virus. Para dilucidar los mecanismos que median esta respuesta decidimos estudiar algunos inmunomoduladores producidos durante la infección por RV de células epiteliales intestinales (CEI). Se usó como modelo de CEI a la línea celular de origen colónico Caco-2, a la cual se le han descrito varias propiedades asociadas con células epiteliales de tipo enterocito.

Usando células Caco-2 polarizadas espontáneamente en cultivo encontramos que con la infección por RV se liberan un conjunto de mediadores considerados anti-inflamatorios (no Th1), entre los que se encuentra la citocina regulatoria TGF- β 1; pero también se liberan las proteínas de choque térmico (PCT) HSC70 y HSP70. Aunque tanto estas PCT como el TGF- β 1 se liberan principalmente de forma soluble, una parte de estas moléculas podrían liberarse de una forma asociada a vesículas de membrana (VM). Estas VM fueron concentradas por ultracentrifugación y caracterizadas de acuerdo a las metodologías descritas para estudiar exosomas, como son la presencia (CD63, actividad acetilcolinesterasa, lactaderina) o ausencia (calnexina, histona H2B) de algunos marcadores, sus características morfológicas por microscopia electrónica y el análisis de algunos de los marcadores estudiados a través de la flotación sobre un gradiente lineal de sacarosa. De esta forma se encontró que durante la infección por RV de las CEI se incrementa la liberación de una población heterogénea de VM, en la cual se encontraron algunas con características típicas de exosomas, pero también otras que podrían considerarse de cuerpos apoptóticos.

A las VM se les han propuesto diferentes propiedades inmunomoduladoras como son la capacidad de participar en mecanismos de transferencia antigénica hacia células presentadoras de antígenos favoreciendo finalmente respuestas inmunes específicas, o por otro lado, la de poder inhibir a los LT cuando interactúan directamente sobre ellos. Aunque no evaluamos la primera de ellas, pensamos que es posible que estas VM tengan la potencialidad de mediar esta función ya que dentro de la caracterización de estas VM se encontró que una pequeña parte de antígeno de RV se asocia a ellas. Por otro lado, se evaluó la función inhibidora de LT a través de un ensayo sobre LT purificados y activados con la enterotoxina B de *Staphylococcus spp* (SEB) en el cual se estudió el efecto que pudieran tener las VM sobre la viabilidad y sobre la proliferación de estas células inmunes. Encontramos que los dos tipos de vesículas (exosomas y del tipo cuerpos apoptóticos), derivados de las células infectadas, afectan en menor o mayor grado la función de LT estimulados policlonalmente con SEB. Estos efectos son en parte mediados por la citocina TGF- β 1, la cual también se encontró asociada a esta fracción heterogénea de VM. Por lo tanto, proponemos que este podría ser un mecanismo inmunomodulador mediado por el RV durante su infección a CEI, que podría explicar en parte la baja respuesta de LT observada durante la infección por RV.

2. INTRODUCCION

La infección por RV es una de las principales causas de gastroenteritis (GE) severa en niños con un impacto importante desde el punto de vista de la morbi-mortalidad; causando aproximadamente 111 millones de episodios de GE al año, de los cuales unos 25 millones implican visitas médicas, con unos dos millones de hospitalizaciones y hasta unas 600.000 muertes (Angel, Franco, Greenberg, 2007; Parashar et ál., 2006; Ramig, 2004). A pesar que en la actualidad existen dos vacunas licenciadas, se requiere un mejor entendimiento de la respuesta inmune contra el RV para mejorarlas o quizás desarrollar unas nuevas; esto debido a que las actuales parecen ser menos eficaces en países en vías de desarrollo (Patel et ál., 2009) y que aún no es del todo clara su eficacia frente a la posibilidad de la emergencia de nuevas cepas.

Uno de los aspectos sobresalientes de la respuesta inmune contra el RV es que no es completamente protectora contra la re-infección. En el grupo de inmunidad de mucosas de la Universidad Javeriana se ha descrito que la respuesta de LT CD4+ y CD8+ específicos de RV es relativamente pobre (Jaimés et ál., 2002; Rojas et ál., 2003) y por lo tanto, esto podría estar relacionado con la falta de protección observada.

El RV se replica de una forma muy localizada en los enterocitos terminalmente diferenciados del intestino delgado (Ramig, 2004). La mucosa intestinal, por ser un sitio de tránsito obligado de una multitud de antígenos provenientes de alimentos y la flora intestinal, se constituye en un sitio altamente tolerogénico (Izcue y Powrie, 2008). Este microambiente podría ser responsable de generar los mecanismos inmureguladores capaces de modular la respuesta inmune contra el RV. Por lo tanto, la identificación de moléculas o estructuras inmunomoduladoras producidas durante la interacción entre el RV y la célula epitelial intestinal y que sean capaces de romper o promover esta tolerancia, puede llevar a la dilucidación de los mecanismos encargados de regular la respuesta inmune contra este virus.

Se ha propuesto que durante la agresión o el daño causado a los tejidos se puede producir la liberación de señales de peligro endógenas como las proteínas de choque térmico (PCT) (Barreto et ál., 2003; Javid, MacAry, y Lehner, 2007; Matzinger, 2007; Wheeler et

ál., 2009). Estas proteínas de choque térmico pueden modular la respuesta inmune a través de la interacción directa con células presentadoras de antígeno y/o quizás mediar la transferencia antigénica a través de su capacidad para unirse a ciertas secuencias peptídicas (actividad de tipo chaperona); aunque este último punto es bastante controvertido (Asea et ál., 2000; Javid, MacAry, y Lehner, 2007; Lev et ál., 2008; Warger et ál., 2006).

El papel que juegan las PCT en el desarrollo de una respuesta inmune también podría estar asociado a la participación que hacen estas moléculas en vesículas de membrana (VM) conocidas como exosomas (Bausero et ál., 2005; Clayton et ál., 2005; Gastpar et ál., 2005). A estos exosomas se les han atribuido papeles moduladores de la respuesta inmune; por un lado, estimulando el desarrollo de respuestas inmune específicas (Andre et ál., 2002; Raposo et ál., 1996) y por otro lado inhibiendo la respuesta inmunológica (Clayton et ál., 2007; Huber et ál., 2005). El tipo de respuesta generada podría estar asociada con el tipo de célula que dio origen a la VM. De esta forma, exosomas de células presentadoras de antígeno median respuestas inmunes específicas (Raposo et ál., 1996; They et ál., 2002), mientras que aquellos de células provenientes de algunos tejidos tolerogénicos favorecen una regulación negativa de la respuesta inmune (McKechnie et ál., 2006; Ostman, Taube, y Telemo, 2005).

En el presente trabajo se estudió la producción de PCTs y su asociación a VM durante la infección por RV de células Caco-2, usadas como modelo de CEI. Aquí se postula que estas VM tienen actividades inmunomoduladoras que interfieren con la función de LT.

3. HIPOTESIS

La infección por RV de células epiteliales intestinales produce la liberación de moléculas y/o estructuras que favorecen un ambiente tolerogénico responsable de la baja respuesta de LT observada.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos Generales

4.1.1. Estudiar el efecto de la infección por RV de CEI sobre la liberación de PCT y VM como posibles moléculas y estructuras de tipo inmunomodulador.

4.1.2. Determinar el papel inmunoregulador de las VM producidas durante la infección por RV de CEI.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Caracterización de la liberación de PCT y VM durante la infección por RV de CEI

4.2.1.1. Evaluar la liberación de las proteínas HSC70 y HSP70 durante la infección por RV de células Caco-2 polarizadas como modelo de CEI.

4.2.1.2. Determinar y caracterizar la liberación de VM durante la infección por RV de células Caco-2.

4.2.1.3. Si el RV induce liberación de VM, determinar si se encuentran o no asociadas a antígeno de RV.

4.2.1.4. Estudiar si las asociaciones entre estas moléculas y/o estructuras con antígeno de RV encontradas *in vitro* podrían tener alguna relevancia *in vivo*, con su determinación en heces de niños infectados.

4.2.2. Estudio del efecto inmunoregulador de VM liberadas por CEI durante la infección por RV

4.2.2.1. Determinar si las VM liberadas durante la infección por RV afectan la viabilidad de LT estimulados policlonalmente.

4.2.2.2. Analizar si las VM liberadas durante la infección por RV interfieren con la proliferación de LT estimulados policlonalmente.

5. JUSTIFICACION

El RV es un importante patógeno intestinal por ser el agente etiológico más frecuente de gastroenteritis severa en niños (Angel, Franco, y Greenberg, 2007). Para el desarrollo de vacunas nuevas más eficientes y seguras es necesario entender mejor la respuesta inmune al RV, la cual no es del todo protectora de la reinfección. Trabajos previos del grupo han mostrado una respuesta pobre de LT CD4+ y LT CD8+ específicos de RV después de infección natural en adultos y sobre todo en niños (Jaimes et ál., 2002; Rojas et ál., 2003). Una buena respuesta T es importante, entre otros, para el desarrollo de anticuerpos protectores. El RV se replica con preferencia a nivel de enterocitos y por lo tanto el intestino puede ser determinante en los mecanismos de regulación responsables de esta baja respuesta de LT, dado que este es un microambiente altamente tolerogénico. Por esta razón, hemos venido investigando posibles inmunomoduladores producidos durante la infección por RV de células Caco-2 polarizadas, usadas como un modelo *in vitro* de células epiteliales intestinales (CEI).

Se ha descrito que durante la infección por RV de células susceptibles, la PCT HSC70 (proteína de choque térmico expresada constitutivamente, y no inducible por estrés térmico) participa activamente en la entrada del virus a la célula (Guerrero et ál., 2002); de igual forma, la HSP70 (proteína de choque térmico inducible por estrés) controla la disponibilidad de proteínas virales durante la morfogénesis viral (Broquet et ál., 2007). Se ha propuesto que las PCTs pueden ser liberadas de una forma activa durante el estrés celular (Barreto et ál., 2003; Broquet et ál., 2003; Hunter-Lavin et ál., 2004) y actuar como señales de peligro para el sistema inmune. Por lo tanto, la participación de estas PCTs durante el ciclo viral del RV nos ha hecho pensar que la infección por RV podría ser un excelente modelo para estudiar el papel de estas moléculas como inmunomoduladores en infecciones víricas.

La liberación de las PCT se ha asociado con VM conocidas como exosomas (Clayton et ál., 2005; Gastpar et ál., 2005). A estas estructuras vesiculares se les han descrito funciones inmunomoduladoras, en parte relacionadas con el tipo de célula que las originan. De esta forma, a exosomas derivados de CEI se les han atribuido funciones inmunosupresoras de la respuesta inmune, aunque también imunoestimulantes (Mallegol

et ál., 2007; Ostman, Taube, y Telemo, 2005; Van Niel et ál., 2003). Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo exploramos la posibilidad que durante la infección por RV se liberen PCT en parte asociadas a este tipo de estructuras. De igual forma, se estudió la asociación de antígeno de RV a estas VM, así como el papel funcional de estas vesículas sobre LT activados policlonalmente.

6. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

6.1. Rotavirus: Patogénesis y Ciclo viral

El RV es el principal agente causal de diarrea severa en niños en todo el mundo con un impacto importante desde el punto de vista de morbi-mortalidad. Las muertes relacionadas con RV representan aproximadamente el 5% de todas las muertes en niños menores de 5 años alrededor del mundo (Dennehy, 2008). A los 5 años de edad, 1 de cada 50 niños será hospitalizado y 1 de cada 250 habrán muerto por causas asociadas con RV; siendo principalmente estas muertes en países en vía de desarrollo. En los últimos años ha habido un incremento en el porcentaje de niños hospitalizados por diarreas causadas por RV (hasta el 40% de las hospitalizaciones por diarrea), quizás debido a una disminución de las causadas por bacterias, asociado con un mejoramiento en la calidad del agua y la higiene (Greenberg y Estes, 2009). El virus infecta a las células epiteliales del intestino delgado, y la infección lleva al desarrollo de fiebre, vómito y diarrea en los niños. La deshidratación y el desbalance de electrolitos son las secuelas principales de la infección por RV y ocurre más frecuentemente en los niños más pequeños (Dennehy, 2008).

RV comprende un género dentro de la familia Reoviridae. Es un virus no-envuelto con una cápside viral compuesta por una estructura trilaminar (Fig 6.1) que rodea un genoma con 11 segmentos de ARN de doble cadena. Este genoma viral codifica para seis proteínas estructurales y seis proteínas no estructurales, cada una codificada por un segmento único, excepto para las proteínas no estructurales NSP5 y NSP6 codificadas por un fragmento de lectura de un solo segmento que se superpone (Ramig, 2004). La parte más interna del virión está formada por 120 moléculas de VP2, las cuales rodean el genoma viral, y 12 copias de VP1, una ARN polimerasa dependiente de ARN, además de la proteína VP3, una guanilil transferasa y metilasa. La capa media esta formada por 260 trímeros de VP6, conformando junto con la capa más interna las partículas de doble capa (DLPs). Las partículas de tres capas (TLPs) con un tamaño cercano a 100 nm se forman a partir de la adquisición de una capa más externa constituida por las proteínas VP4 y VP7: organizadas con 780 copias de la glicoproteína VP7 como trímeros y 60 espículas formadas por trímeros de VP4 (Lopez y Arias, 2006). El género RV está dividido en diferentes grupos definidos serológicamente (del A al E), siendo de los grupos A al C los

que infectan a los humanos, mientras que todos los grupos pueden infectar a las demás especies de animales (Ramig, 2004). Los diferentes serotipos de RV se definen a partir de determinantes de neutralización sobre VP4 (serotipo P, por proteína sensible a proteasa) y sobre VP7 (serotipo G, por glicoproteína). Alternativamente, el análisis de secuencia de los genes VP4 y VP7 es también usada para clasificar estos genes en diferentes genotipos que se correlacionan con los serotipos determinados serológicamente (Lopez y Arias, 2006).

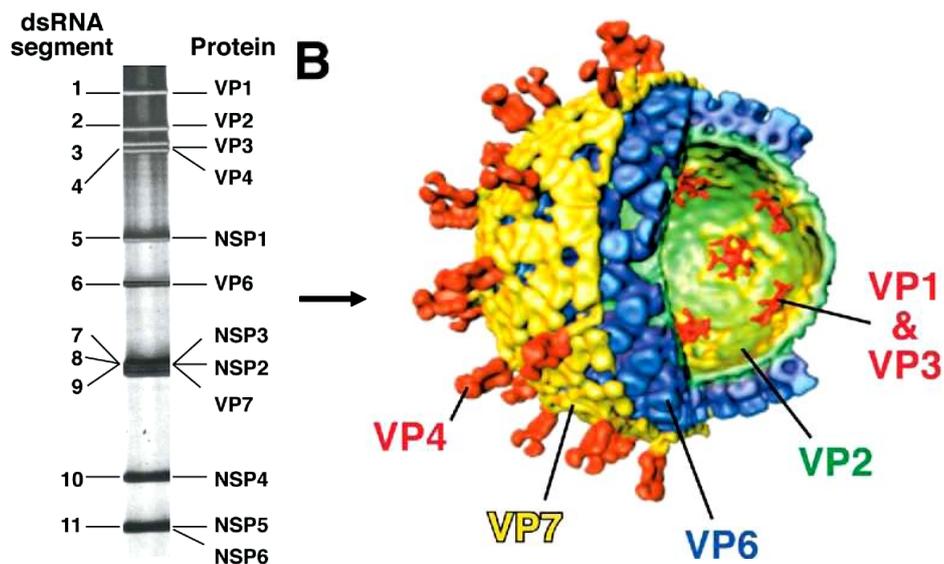


Fig 6.1. Modelo estructural del RV. Se muestran los números de segmentos ARN de doble cadena, las proteínas que codifican y su organización estructural conformando las partículas virales completas (Greenberg y Estes, 2009).

El RV se replica en los enterocitos completamente diferenciados cerca de las puntas de las vellosidades intestinales. En los modelos animales, los cambios patológicos son casi exclusivamente limitados al intestino delgado revelando lesiones muy leves como vacuolización y pérdida del enterocito, o algunos cambios más grandes como pérdida de la punta de la vellosidad e hiperplasia de la cripta. La inflamación es generalmente leve comparada con otros patógenos intestinales y no hay una correlación absoluta entre lesiones histológicas y síntomas de la enfermedad (Ramig, 2004).

Se ha considerado que la diarrea es producto de una malabsorción secundaria a la destrucción del enterocito. La malabsorción produce el tránsito de mono y disacáridos, carbohidratos, ácidos grasos y proteínas no digeridos hacia el colón, y este bolo no digerido es osmóticamente activo, y el colón no puede absorber suficiente agua produciendo una diarrea osmótica. También se ha sugerido que la diarrea ocasionada por RV es de tipo secretoria, ocasionada por una respuesta inflamatoria, en parte basado en los niveles elevados de prostaglandina E2 (PGE2) en el intestino infectado (Zijlstra et ál., 1999). Otros han propuesto que la proteína viral no estructural NSP4, un fragmento secretado de NSP4, o ciertos péptidos NSP4 tienen actividad del tipo enterotóxina e inducen diarrea cuando se inoculan en ratones (Ball et ál., 1996). Durante la infección del enterocito, eventos intracelulares, que probablemente involucran a NSP4, producen liberación de Ca^{2+} del RE. El incremento en Ca^{2+} intracelular dispara algunos procesos celulares que incluyen daño de la red de citoesqueleto de las microvellosidades, reducción en la expresión de disacaridasas y otras enzimas en la superficie apical e inhibición general de los sistemas de co-transporte de solutos de Na^+ , y necrosis (Ramig, 2004). Un aspecto que también se ha evaluado son los mecanismos reguladores responsables de la de la diarrea secretoria. De esta forma, se ha observado que el RV puede evocar el fluido intestinal y la secreción de electrólitos a través de activación del sistema nervioso del intestino; dependiente en parte de neuronas secreto motoras activadas por el péptido intestinal vasoactivo (VIP), así como de la participación de la serotonina (Kordasti et ál., 2004; Lundgren et ál., 2000)

Se han caracterizado *in vitro* algunos posibles receptores celulares que median el tropismo del virus a las células blanco. En esta interacción las proteínas de la capa externa del RV VP4 y VP7 establecen contactos con receptores celulares como ácido siálico, las integrina $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 4\beta 1$, y la proteína HSC70. Las espículas de VP4 son susceptibles del “clivaje” proteolítico por tripsina, induciendo cambios conformacionales en la estructura de la espícula para exponer sitios claves en la interacción con co-receptores celulares (Greenberg y Estes, 2009). Se ha propuesto que la entrada del RV a la célula es un proceso de por lo menos tres pasos que se dan de forma secuencial. De esta forma, el contacto inicial en cepas de RV sensibles a neuraminidasa se da a través del dominio VP8* de VP4 con un receptor celular que contiene ácido siálico (muy probablemente un gangliósido). Esta interacción inicial produce un cambio

conformacional en VP4 para permitir que el virus se una a un segundo receptor celular resistente a neuraminidasa (se ha propuesto a $\alpha 2\beta 1$) a través del motivo de unión DGE de VP5*. En seguida, de una a tres diferentes interacciones se pueden llevar a cabo involucrando contactos entre VP5* (aminoácidos 642 a 659) y HSC70, y VP7 y las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha x\beta 2v$ (Lopez y Arias, 2006; Zarate et ál., 2003). La interacción entre la HSC70 y el virus depende del dominio de unión al péptido de la actividad de tipo ATPasa de estas proteínas chaperonas, regulando quizás cambios conformacionales sobre la partícula viral para promover la infección (Perez-Vargas et ál., 2006). El mecanismo de entrada del RV es muy poco conocido. La penetración directa de la membrana también se ha propuesto como un posible mecanismo, a partir de los datos de microscopía electrónica y el hecho que el RV induce una rápida permeabilización de la membrana (Kaljot et ál., 1988). Por ser un virus no envuelto se ha sugerido que la vía endocítica clásica podría ser el mecanismo, sin embargo, la infectividad por RV no es inhibida cuando se evita la acidificación de los endosomas o se bloquea el tráfico intracelular de vesículas endocíticas. Algunos hallazgos han permitido proponer a una vía endocítica no clásica, la cual es dependiente de “rafts” y definida por su independencia de clatrina y caveolina, su dependencia de dinamina y su sensibilidad a la depleción de colesterol (Isa et ál., 2004; Sanchez-San Martin et ál., 2004).

Poco después de la entrada, los ARNs virales son entregados al citosol y comienzan a ser traducidos en ribosomas libres (Jayaram et ál., 2002; Vende et ál., 2000). Nuevas partículas de RV se ensamblan parcialmente en el viroplasma, una estructura especializada y localizada cerca al retículo endoplasmático (RE), donde las proteínas VP7 y NSP4 son sintetizadas como proteínas transmembrana. Se ha propuesto que DLPs que contienen VP1, VP2, VP3 y VP6 salen del viroplasma y entran al RE a través de interacciones con NSP4 y allí estas partículas en maduración adquieren una envoltura de membrana pasajera que contiene VP4, NSP4 y VP7 (Delmas et ál., 2004). El correcto ensamblaje de partículas virales infecciosas depende de la glicosilación de NSP4, la formación de puentes disulfuro en VP7 y concentraciones adecuadas de ATP y calcio en el RE. En seguida, NSP4 debería moverse a los sitios de contacto entre RE y trans-golgi, donde se podría asociar con los “rafts” lipídicos. Para el ensamblaje final VP4 necesita ser adicionado antes de VP7 (Trask y Dormitzer, 2006). Finalmente, el modelo propone un evento de fusión entre un compartimento en los cuales los viriones en maduración se

encuentran (muy probablemente derivado del RE) y un compartimiento que contiene “rafts” en el cual se encuentra VP4. Se ha especulado que dos proteínas celulares PRA1 y rab5 están involucradas en el control del tráfico de VP4 en estos pasos de morfogénesis del RV antes del ensamblaje final. Recientemente, a través de ensayos de ARN de interferencia se ha propuesto que los miembros de los dos sistemas de plegamiento del RE, sistema de chaperonas calnexina/calreticulina y grp78 parecen ser requeridos para el ensamblaje de los TLPs (Maruri-Avidal, Lopez, y Arias, 2008). Los viriones completos recién formados son dirigidos a la membrana apical dentro de vesículas que contienen “rafts” debidos a una señal presente sobre VP4 (Delmas et ál., 2004). Se ha propuesto que los mecanismos de liberación del RV parecen no seguir una ruta de exocitosis clásica, aunque el virus es liberado de una forma claramente apical en células epiteliales polarizadas (Jourdan et ál., 1997). Se ha propuesto que esta liberación se da de una forma activa en ausencia de muerte celular; aunque respecto a este punto podría haber algo de controversia, ya que se ha descrito que la infección por RV genera muerte celular por apoptosis (Boshuizen et ál., 2003; Chaibi et ál., 2005).

6.2. El Sistema Inmune de la Mucosa Intestinal:

Las superficies de las mucosas del tracto intestinal, respiratorio y genitourinario son la puerta de entrada más importante de microorganismos patógenos en el hospedero. La mucosa del intestino, por ser una de las principales superficies de contacto entre el ambiente externo y el cuerpo, es un sitio determinante en la discriminación entre antígenos asociados y no asociados con patógenos (Izcue y Powrie, 2008; Kagnoff y Eckmann, 1997). De esta forma, la homeostasis intestinal es determinada por una interrelación dinámica entre el sistema inmune, el tejido intestinal, y la flora y los componentes de la dieta presentes en el lumen. Los componentes inmunológicos de la mucosa pueden dividirse en dos partes principalmente, los tejidos linfoides asociados a mucosa (MALT, denominados GALT a nivel del intestino), donde las respuestas inmunes específicas de antígeno se inician (sitio inductor), y la lámina propia, los cuales son los sitios efectores para la producción de IgA y las respuestas de LT (Kunisawa, Nochi, y Kiyono, 2008) Los GALT básicamente son las placas de Peyer (PP) y los folículos linfoides aislados. A diferencia de otros órganos linfoides secundarios, los MALT no poseen un sistema de drenaje aferente, por lo que la llegada del antígeno depende de una región epitelial especializada llamada epitelio asociado a folículo (FAE) conformado por

las denominadas células M. El antígeno que ingresa a estos MALT a través de los FAE puede provenir de los sitios efectores donde está ocurriendo el desafío inmunológico. La información tanto de los sitios efectores como de los GALT es llevada a través de la linfa intestinal hacia los nódulos linfoides mesentéricos, los cuales son fundamentales para determinar la localización anatómica de las respuestas tolerogénicas o inflamatorias (Izcue, Coombes, y Powrie, 2009).

La mucosa intestinal contiene un gran número de LT localizados dentro de los GALT, haciendo parte de las estructuras linfoides asociadas y distribuidos difusamente a lo largo de la lámina propia así como de forma subyacente a las CEI. Los linfocitos de la lámina propia corresponden a células tanto CD4+ como CD8+ convencionales de memoria o previamente activadas que provienen de los órganos linfoides secundarios asociados a intestino; mientras que los linfocitos intraepiteliales son principalmente CD8+, con una ontogenia que no es del todo esclarecida. Estos LT parecen jugar papeles cruciales en la mucosa intestinal que incluyen el mantenimiento de la función de barrera intestinal y la homeostasis del tejido, así como la defensa frente a patógenos intestinales. La localización de las diferentes poblaciones linfocitarias en la mucosa intestinal depende de una serie de interacciones celulares entre las cuales se tienen la expresión en los linfocitos T de la integrina $\alpha 4\beta 7$, la integrina $\alpha E(CD103)\beta 7$ y el receptor de quimiocina CCR9 los cuales interactúan con sus correspondientes ligandos, la proteína MadCAM-1 expresada de forma constitutiva sobre el endotelio vascular de la lámina propia intestinal, la cadherina E expresada sobre la superficie basolateral de los enterocitos intestinales y CCL25 (también conocido como TECK) el cual es constitutivamente y selectivamente expresado por las células epiteliales del intestino delgado (Agace, 2008).

El epitelio intestinal es fundamental en la mucosa ya que, además de conformar una barrera selectiva constituida principalmente por células epiteliales intestinales (CEI) estrechamente unidas a través de uniones sellantes (“tight junctions”), juega un papel muy activo en la inmunidad produciendo directamente péptidos antimicrobianos y generando citocinas proinflamatorias como señales de alarma en respuesta al reconocimiento de algunos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Izcue, Coombes, y Powrie, 2009). Se han propuesto algunos mecanismos para explicar la discriminación que pueden mediar las CEI entre microorganismos patogénicos y

comensales para permitir el desarrollo o no de una respuesta inmune. Se postula que los microorganismos patógenos, a diferencia de los comensales, logran romper la barrera epitelial mediante algunos factores de virulencia y de esta forma estimular una respuesta inmune innata, quizás a través de componentes del sistema inmune de la lamina propia. Además, las CEI cuentan con mecanismos de reconocimiento de PAMPs por la expresión y localización de receptores como TLRs (“Receptores del tipo Toll”) y NLRs (receptores del tipo NOD “nucleotide oligomerization domain”) que podrían regular esta discriminación, favoreciendo o evitando el desarrollo de una respuesta inmune innata. Por ejemplo, las CEI expresan poco o nada TLR2, TLR4 y CD14 minimizando el reconocimiento de LPS bacterianos. La localización intracelular de otros TLR (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9) y de NLR puede discriminar los comensales de los patógenos, porque estos últimos son los que lograrían acceder a estos compartimentos intracelulares. De igual forma, TLR5, responsable del reconocimiento de la flagelina bacteriana, se encuentra localizado en la membrana basolateral (Artis, 2008). También se ha propuesto que la señalización a través de los NLR regula negativamente la activación dirigida por receptores TLR por el reconocimiento de bacterias intestinales, de tal forma que ante la ausencia de una señalización funcional por NOD se ha visto una activación NFκB incrementada concomitante a una inflamación crónica (Vroling, Fokkens, y van Drunen, 2008)

El balance entre el hospedero y la flora se mantiene a través de diversos mecanismos reguladores que evitan que el sistema inmune reaccione hacia antígenos inocuos presentes en el intestino. Este balance puede ser alterado por diferentes factores como son el incremento de estímulos proinflamatorios producto de la señalización por intermedio de receptores de las CEI o el daño de la barrera intestinal producto de un proceso infeccioso (Izcue, Coombes, y Powrie, 2009). Por otro lado, las CEI pueden responder a un amplio rango de señales provenientes desde debajo de la mucosa, ya que poseen receptores para varias citocinas como IFN- γ , IL-1, TNF- α , TGF- β 1 entre otras (Kagnoff y Eckmann, 1997), que se pueden generar a partir de elementos del sistema inmune localizados en la lámina propia.

.

Las CEI pueden regular la función de células dendríticas mediante la secreción de moléculas con capacidad inmunoreguladora como TSLP, TGF- β y prostaglandina E2,

llegando en algunos casos a favorecer la generación de LT reguladores (LTreg) (Artis, 2008). De igual forma, las CEI pueden favorecer respuestas de LB a partir de factores como BAFF (factor de activación de células B), APRIL (ligando inductor de proliferación) ó citocinas como TSLP e IL-10. La posibilidad de expresar moléculas CMH-II por parte de las CEI hace pensar que pueden estimular respuestas de LT, aunque con fenotipo de memoria debido a la ausencia de moléculas coestimuladoras. De igual forma, se propone que estas CEI podrían favorecer la entrega de señales inhibitorias o tolerogénicas directamente a los LT (Artis, 2008).

Finalmente, este microambiente de citocinas producido podría modular la respuesta inmune ante la presencia de un antígeno determinando, por ejemplo, inducir la generación de LT con un fenotipo inflamatorio como los linfocitos Th17 o en contraste a uno regulador (linfocitos Tr1, Treg, Th3). Por ejemplo, TGF- β , citocina abundantemente producida en el tejido intestinal, es esencial tanto para la generación de LT reg FOXP3+ como para las células Th17. Se ha observado que en compañía de IL-6 e IL-23 el TGF- β puede favorecer el desarrollo de Th17, mientras que en conjunto con IL-27 e IL-6 induce la diferenciación de LT productores de IL-10 similares a Tr1 (Benson et al., 2007; Kunisawa, Nochi, y Kiyono, 2008). De igual forma, se ha observado que el ácido retinoico producido por ciertas poblaciones de CD intestinales puede regular la generación de LT reg FOXP3+ inhibiendo el desarrollo de LT Th17 de una forma dependiente de señalización por TGF- β (Benson et ál., 2007; Xiao et ál., 2008).

6.3. Células Caco-2 como modelo de CEI:

Una de las principales células encontradas en el intestino delgado es el enterocito. Estas células se originan durante el desarrollo a partir del endodermo intestinal embrionario y después del nacimiento a partir de las células presentes en la región de la cripta intestinal. Los enterocitos son células altamente polarizadas generadas por su contacto con la membrana basal y con las células adyacentes. En la parte apical de la célula diferenciada se forma una estructura a partir de proyecciones citoplasmáticas que conforman unas microvellosidades bien organizadas (“membrana con borde de cepillo”), donde se van a expresar en las porciones de membrana plasmática proteínas transportadores e hidrolasas, que aseguran las funciones absorptivas y digestivas de estas células (Simon-Assmann et ál., 2007).

Se han tratado de establecer diferentes modelos *in vitro* que permitan tener células con características propias de los enterocitos bien diferenciados. Algunos intentos se han hecho para obtenerlas a partir de células obtenidas del endodermo fetal, sin embargo, han fallado debido a su pobre sobrevivencia *ex vivo* (Simon-Assmann et ál., 2007). Para mejorar de mejorar la sobrevivencia de enterocitos diferenciados se ha tratado de mediar su immortalización, por ejemplo, directamente sobre cultivos primarios o con el uso de ratones transgénicos que llevan el transgen SV40 tag (Bens et ál., 1996; Quaroni y Beaulieu, 1997).

Otros tipos de desarrollo implicaron el empleo de líneas celulares tumorales colónicas. En 1964 se estableció la primera línea a partir de un carcinoma de colón humano, la línea celular HT-29. Debido a su origen tumoral, las líneas celulares tienen una alta diversidad en el estado de diferenciación y en sus propiedades proliferativas y metabólicas. Bajo condiciones estándar de cultivo la mayoría de estas líneas celulares no se diferencian. Sin embargo, la línea de cáncer colónico-2 (Caco-2) de origen humano se diferencia espontáneamente en cultivo después de alcanzar la confluencia, conformando células fuertemente unidas entre sí por uniones sellantes (“tight junctions”) y con microvellosidades apicales bien desarrolladas. A pesar de su origen de colón humano adulto, estas células después de 2 a 3 semanas en cultivo pos-confluencia expresan disacaridasas (lastasa, sacarosa isomaltasa), fosfatasa alcalina y peptidasas, enzimas típicas de la vellosidad intestinal; además pueden transportar iones y agua hacia la membrana basolateral (Casola et ál., 1998; Simon-Assmann et ál., 2007; Van Beers et ál., 1995).

In vitro, el RV se une a una amplia variedad de líneas celulares, aunque solamente algunas de ellas pueden ser productivamente infectadas; estas incluyen células de origen renal e intestinal, y líneas transformadas derivadas de seno, estómago, hueso y pulmón. Las células que más se han usado para la infección por RV son la línea celular epitelial de riñón de mono MA-104 y la línea celular Caco-2 (Lopez y Arias, 2006).

Algunas propiedades típicas de enterocitos presentes en estas líneas de origen colónico han permitido evaluar *in vitro* características pato-fisiológicas observadas durante la

infección por RV. Por ejemplo, se había postulado que la disminución en las actividades de las disacaridasas observadas durante la infección por RV se producían por la destrucción de los enterocitos maduros de las puntas de las vellosidades; sin embargo, usando la línea celular Caco-2, se observó que la infección disminuye tanto la actividad como la expresión apical de sacarosa isomaltasa sin una aparente destrucción celular (Jourdan et ál., 1998). Recientemente, se mostró que la infección por RV daña la actividad de la lactasa presente en la membrana en borde en cepillo de una forma dependiente de la NSP4 secretada durante la infección de células Caco-2, explicando la pérdida de actividad lactasa asociada con la intolerancia a la lactosa observada en los niños infectados por RV (Beau et ál., 2007). De igual forma, se han hecho otro tipo de estudios aprovechando que las Caco-2 son un modelo extensivamente caracterizado para la permeabilidad epitelial intestinal; ya que las células desarrollan polarización de distintas superficies apicales y basolaterales separadas por las uniones estrechas. En este contexto, se ha demostrado que la infección por RV causa un incremento en la permeabilidad paracelular asociada con disfunción metabólica. Cambios en la permeabilidad paracelular pueden contribuir a la enfermedad, alterando la secreción intestinal y la absorción y permitiendo la penetración de la mucosa por sustancias potencialmente tóxicas e inflamatorias; y por lo tanto, estos hallazgos pueden tener implicaciones importantes para la patogénesis de la diarrea. La permeabilidad incrementada durante la infección por RV ha sido bien documentada *in vivo* con el uso de marcadores como lactulosa y manitol (Dickman et ál., 2000).

La diferenciación de las células Caco-2 se ha evaluado a través de la formación de la barrera epitelial, la expresión de marcadores específicos y el transporte epitelial por transcitosis. La conformación de la barrera se produce a medida que las células establecen las uniones estrechas por ocludinas, la cual se determina a través de la resistencia transepitelial (TER) durante su cultivo en filtros TW ($> 300 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$) y la impermeabilidad a moléculas entre 400-70000 Da (Dickman et ál., 2000; Rimoldi et ál., 2005). Los otros dos factores se han evaluado por medio de la expresión diferencial de algunos marcadores en las porciones de la membrana apical como las enzimas sacarosa y lactasa isomaltasas, y la dipeptidil peptidasa tipo IV (CD26); así como la determinación de la transitocis de la peroxidada de rábano picante (Heyman et ál., 1990; Jourdan et ál., 1997; Van Beers et ál., 1995).

6.4. Las vacunas contra el RV

En cuanto a las vacunas contra el RV, la vacuna oral Rotashield fue la primera en ser licenciada. Es una vacuna tetravalente producida a partir de virus “reasortantes” de simio y humano (RRV), la cual incluyó únicamente genes de RV humanos para VP7. Pero luego de la inclusión de esta vacuna en el esquema de inmunización en USA fue retirada del programa por varios casos de intususpección reportados. En la actualidad, otras dos vacunas compuestas por virus vivos atenuados han sido licenciadas globalmente (Rotateq de Merck y Rotarix de GlaxoSmithkline) contra la GE causada por RV. Rotateq es una vacuna desarrollada de un virus animal (cepa de RV bovino WC3) que contiene 5 virus “reasortantes” humanos: 4 que expresan diferentes proteínas VP7 (G1, G2, G3 o G4) y que expresan la proteína VP4 (P7[5]) de la cepa WC3 bovina, y 1 virus “reasortante” que expresa la proteína de unión (P1A[8]) de la cepa parental de RV humano y la proteína de la cápside externa G6 de la cepa parental de RV bovino (Angel, Franco, y Greenberg, 2007; Dennehy, 2008). Algunos estudios evaluando la eficacia de esta vacuna pentavalente han mostrado que protege en un 74,6% contra la GE aguda causada por RV sin tener en cuenta la severidad de la diarrea, de un 87% para aquellas que requerían visita al médico y de un 100% frente al desarrollo de GE severa (Clark et ál., 2004; Greenberg y Estes, 2009). Rotarix, por otro lado, es una vacuna oral monovalente atenuada compuesta de un virus de origen humano del genotipo G1/P8, derivada de la cepa 89-12. Uno de los problemas de esta vacuna es que aún no se conocen las bases genéticas de su atenuación; por lo tanto los seguimientos ante posibles cambios que lleven a una reversión de la atenuación no se pueden hacer. Se ha observado que aunque los niños vacunados con Rotarix desarrollan bajos niveles de anticuerpos neutralizantes (quizás por el efecto de los anticuerpos maternos circulantes) están bien protegidos; especialmente para el desarrollo de GE severa (Angel, Franco, y Greenberg, 2007; Dennehy, 2008). A pesar del carácter monovalente de Rotarix, comparado con el 92% de la protección contra la cepa homotípica G1, esta vacuna protegió en un 88% contra virus heterotípicos G3, G4 y G9 y un 42% contra G2 (Greenberg y Estes, 2009). Aunque estas dos vacunas han tenido excelentes eficacias, aún no son claros algunos aspectos como cual sería su desempeño en países menos desarrollados, donde ya hay indicios de ser menos eficaces (Patel et ál., 2009), la aparición de algunas cepas emergentes frente a las que no se conoce como sería su protección, así como la posibilidad aún no del todo

descartada de generar casos de instususpección (Angel, Franco, y Greenberg, 2007; Greenberg y Estes, 2009).

6.5. Respuesta inmune al RV

La reinfección sintomática con RV es algo frecuente, siendo la severidad y el número de infecciones reducida a medida que avanza la edad del niño. Este hecho sugiere que la inmunidad protectora contra el RV se logra alcanzar, pero se requiere de múltiples infecciones (Coulson et ál., 1992). En un estudio en México, se observó que después de una infección primaria el 40% de los niños era protegido contra una re-infección, el 75% se protegían contra la diarrea causada por una infección subsecuente con RV, y el 88% contra una diarrea severa por RV. La mayoría de infecciones sintomáticas por RV ocurren entre 3 meses y 2 años de edad, con un pico de incidencia entre los 7 y los 15 meses. Una parte de la protección de los neonatos se debe a la presencia de anticuerpos en la madre que han pasado a través de la placenta. Se ha propuesto que la exposición de neonatos de forma asintomática al RV protege al niño de desarrollar diarrea severa por RV más adelante en su infancia (Dennehy, 2008).

El factor que más se asocia con la protección a la reinfección son los anticuerpos de tipo IgA, la cual dependería en parte de la respuesta de LT (Franco, Angel, y Greenberg, 2006). Sin embargo, se ha observado que adultos y niños recientemente infectados presentan bajas frecuencias tanto de LT CD4+, como de LT CD8+ circulantes específicos de RV que secretan IFN- γ en comparación con las respuestas a virus como el citomegalovirus (Jaimes et ál., 2002; Rojas et ál., 2003). En estos análisis se ha observado que durante la infección aguda, los niños infectados con RV tienen más LT CD8+ secretores de IFN- γ que CD4+; esto podría sustentar por un lado el papel de los LT CD8+ en los mecanismos de clarificación viral durante la infección, y por otro lado, los niveles relativamente pasajeros de IgA dependientes de CD4+ (Rojas et ál, 2003). A pesar de que la infección por RV es fuertemente restringida al intestino la presencia de viremia insinúa tanto una respuesta inmune localizada como sistémica, sin embargo, en ratones se ha mostrado que son las células plasmáticas de la mucosa intestinal y no las de circulación sistémica las que tienen un efecto antiviral real (Angel, Franco, y Greenberg, 2007).

Un aspecto importante dentro del desarrollo de una respuesta inmune de memoria es el hecho que los linfocitos tienen la capacidad de migrar a los sitios donde ellos fueron originalmente estimulados con el antígeno y que están relacionados con los sitios efectores hacia donde se debe dirigir la respuesta inmune apropiada (Butcher et ál., 1999). En este aspecto, se encontró una expresión predominante del receptor de direccionamiento hacia la mucosa intestinal $\alpha 4\beta 7$ en LT específicos de RV en comparación con células específicas de citomegalovirus las cuales expresan predominantemente selectina L; aunque de una forma independiente de su capacidad para secretar IFN- γ (Rojas et ál., 2003). Por lo tanto, hasta acá podríamos plantear que durante la infección por RV aunque podría haber un direccionamiento preferencial hacia la mucosa intestinal la respuesta de LT CD4+ es muy baja y quizás insuficiente para apoyar una apropiada producción de IgA.

En ratones se ha encontrado que antígeno viral de RV se puede localizar en células dendríticas (CD), LB y macrófagos en placas de Peyer y nódulos linfoides mesentéricos, insinuando su papel como células presentadoras de antígeno en la inducción de respuestas inmune específicas en estos órganos linfoides secundarios durante la infección por RV (Dharakul et ál, 1988). Una posibilidad que se ha trabajado en el grupo para comprender la relativa baja respuesta de LT es que el RV pueda afectar la función de las CD disminuyendo la inducción de una respuesta inmune específica (Narvaez, Angel, y Franco, 2005). En este estudio se encontró que el RV al parecer no causa la muerte celular de CD inmaduras ni maduras, no inhibió la maduración de las CD inmaduras, ni altero la expresión de marcadores de maduración de las CD maduras. Cuando se evaluó la producción de IL-12 esta fue muy pobre en las CD inmaduras y baja en las maduras, sin embargo, esto no interfirió con su capacidad de célula presentadora de antígeno, ya que se observó una fuerte respuesta alogénica de tipo Th1 (Narvaez, Angel, y Franco, 2005). De este estudio se podría concluir que la interferencia del RV en la funcionalidad de las CD parecería no ser lo suficientemente determinante para explicar la pobre respuesta de LT, por lo que otros mecanismos podrían estar participando.

Teniendo en cuenta que la respuesta inmune contra el RV está claramente asociada con el microambiente donde se localiza y replica el virus, pensamos que las señales generadas durante la interacción entre el virus y las células epiteliales intestinales pueden ser

determinantes en la forma y el tipo de respuesta que se genera contra el RV. El epitelio de la mucosa intestinal se constituye en una importante interfase entre el ambiente externo y el hospedero, con funciones muy bien definidas como son la absorción de nutrientes y la defensa contra agentes infecciosos. Aunque en la mucosa intestinal las células epiteliales son un compartimento con actividades absorptivas y secretorias, mientras que las células del sistema inmune de la mucosa son uno con funciones de defensa, cada vez se tiene más claro que las células epiteliales de la mucosa pueden contribuir de manera muy significativa a la respuesta inmune de la mucosa. Por ser el blanco directo durante la infección por RV, las CEI pueden funcionar como un sistema de alarma a través de la producción de las quimiocinas IL-8, péptido α relacionado con crecimiento (GRO- α), RANTES, IP-10 y MCP-1 los cuales van a favorecer la atracción de diferentes poblaciones celulares como neutrófilos, monocitos, linfocitos, basófilos y eosinófilos (Casola et ál., 1998; Rollo et ál., 1999; Sheth et ál., 1996). Sin embargo, la producción de algunas de estas citocinas podría ser inferior a la generada por otro tipo de infecciones en el intestino, y esto puede tener como consecuencia el hecho que, comparada con infecciones bacterianas, el RV induce poca inflamación (Greenberg y Estes, 2009). Es importante poder determinar otro tipo de moduladores de la respuesta inmune producidos por las células epiteliales intestinales que nos puedan ayudar a entender estos tipos de respuestas generadas contra el RV.

6.6. PCT como reguladoras del sistema inmune:

Las PCT fueron descubiertas por Ritossa en 1962, al observar un patrón de "puffs" de cromosomas de glándula salivar en moscas del género *Drosophila*, como respuesta a la exposición pasajera a elevadas temperaturas. A partir de este trabajo, muchos investigadores han demostrado que la respuesta al choque térmico es tanto ubicua como altamente conservada (desde bacterias a plantas y animales), y que constituye un mecanismo de defensa esencial para la protección de las células contra la exposición a un amplio rango de condiciones peligrosas como el calor, alcohol, inhibidores del metabolismo energético, metales pesados, estrés oxidativo, fiebre o inflamación (Jolly y Morimoto, 2000).

Las PCT se han clasificado en familias de acuerdo a sus masas moleculares. Dentro de cada familia hay miembros que se expresan de forma constitutiva en la célula, regulados

induciblemente, y/o circunscritos a diferentes compartimentos celulares (Jolly y Morimoto, 2000). Los miembros de estas proteínas que se expresan de forma constitutiva y abundante en ausencia de cualquier estrés son esenciales para la viabilidad celular en condiciones normales de crecimiento (Gething y Sambrook, 1992). De esta forma, tenemos en la familia de PCT de 70 kDa, a la proteína HSC70, la cual es expresada de forma constitutiva, y a la proteína HSP70, la cual es inducida durante el estrés. Estas PCTs se localizan en el citoplasma y se les han asociado principalmente funciones de tipo chaperona favoreciendo la estabilización o generación de precursores de proteínas no plegadas antes del ensamblaje en el citosol, la translocación entre organelos incluyendo el retículo endoplásmico y mitocondria, y la estabilización de polipéptidos recién translocados antes del plegamiento y ensamblaje; así como la constitución de oligómeros de proteínas, la disolución de agregados de proteínas y la degradación de proteínas citosólicas de recambio rápido (Gething y Sambrook, 1992).

Los genes para las PCT de 70 kDa están ampliamente distribuidos a través del genoma humano sobre los cromosomas 1, 5, 6 (dentro de los locus génicos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad -CMH-), 11, 14 y 21. Tres genes que codifican miembros de esta familia se localizan en la región clase III del CMH y se han definido como HSPA-1A, HSPA-1B y HSPA-1L. Los genes HSPA-1A y HSPA-1B codifican una HSP-70 inducible por calor. El gen HSPA-1L es constitutivamente expresado a bajos niveles, pero no es inducible por choque térmico (Leung et ál., 1992; Milner y Campbell, 1992). Por otro lado, otro gen que codifica una HSP70 inducible por calor es el HSPA-6 que se encuentra localizado en el cromosoma 1, mientras que el gen que codifica para la proteína HSC70 se encuentra localizado en el cromosoma 11 y se ha denominado HSPA-8 (Tavaria et ál., 1995).

Las funciones asociadas con la participación de las PCT en la respuesta inmune viene de los trabajos donde se identificaron algunas de estas proteínas como antígenos asociados al rechazo de tumor en sarcomas inducidos químicamente en ratones (Srivastava, DeLeo, y Old, 1986). Posteriormente, algunos investigadores propusieron que la expresión anormal de PCT sobre la superficie de las células tumorales favorecía su reconocimiento por parte de células como las NK o los LT $\gamma\delta$ (Multhoff et ál., 1997; Tamura et ál., 1993). En otros grupos prevaleció la idea que las PCT derivadas de tumor transportaban péptidos con

potencial antigénico para favorecer el fenómeno de “cross-priming” terminando finalmente en la activación y función efectora de linfocitos T citotóxicos (CTLs) contra las células tumorales (Blachere et ál., 1997; Srivastava et ál., 1994). Aunque esta función es bastante controversial y no ha podido ser claramente demostrada *in vivo* (Javid, MacAry, y Lehner, 2007). Otras investigaciones sugirieron, por otro lado, que las PC podrían favorecer una señalización a través de receptores sobre células especializadas como las células dendríticas o los macrófagos para favorecer la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas y de esta forma regular la respuesta inmune adquirida (Asea, 2003; Asea et ál., 2000; Basu et ál., 2000; Somersan et ál., 2001). Sin embargo, algunos proponen que estos efectos observados en estos modelos se deben a contaminación de las preparaciones de PCT con algunos PAMPs bacterianos (Gao y Tsan, 2003; Tsan y Gao, 2009). De esta forma, a las PCT se les han atribuido 2 grandes funciones: transportar péptidos con potencialidad antigénica para favorecer el fenómeno de “crosspriming” hacia LT, y servir como señales inmunomoduladoras para regular la respuesta inmune (señales de peligro). A través del fenómeno de “cross-priming” se ha explicado cómo células presentadoras de antígeno profesionales pueden capturar antígeno exógeno (liberado de alguna forma por células tumorales o infectadas por virus) y llevarlo a la vía endógena para su presentación en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad clase I. Por lo tanto, las PCT serían facilitadoras de este cambio de ruta del antígeno endocitado.

Otro aspecto que se ha desarrollado, tiene que ver con la forma en que estas proteínas podrían ser liberadas para favorecer su función inmunomoduladora. Recientemente se ha reportado una liberación activa de células mononucleares de sangre periférica de la proteína inducible HSP70, sin comprometer la viabilidad celular, hecho que podría explicar los niveles de la proteína que se han detectado en el suero de individuos aparentemente normales (Hunter-Lavin et ál., 2004). Nosotros hemos reportado que la proteína constitutiva HSC70 podía ser liberada por la línea celular de origen tumoral K562 bajo estrés ocasionado por calor o la presencia de IFN- γ (Barreto et ál., 2003). Esta liberación de PCT bajo estrés también se ha reportado a partir de células Caco-2 en presencia de choque térmico, donde se ha encontrado una liberación activa de la proteína HSP70 a partir de células polarizadas (Broquet et ál., 2003). En este último trabajo, se ha sugerido que la liberación de la HSP70 se hace por una vía exocítica no clásica, ya que

ésta no es sensible a inhibidores como la monensina, la brefeldina o la tunicamicina; y al parecer el mecanismo de liberación estaría asociado con la producción de los denominados “rafts” lipídicos, porque al tratar las células con metil- β -ciclodextrina se disminuye la liberación de HSP70. Sin embargo, la liberación de esta PCT asociado con la conformación de “rafts” puede ser un evento dependiente del tipo celular, ya que ensayos de liberación de HSP70 por estrés térmico a partir de PBMCs no son sensibles al tratamiento con metil- β -ciclodextrina (Lancaster y Febbraio, 2005). Estudiando la liberación de la proteína HSP70 a partir de líneas celulares de origen colónico (Gastpar et ál., 2005) o de células K562 estresadas por calor (Bausero et ál., 2005), se encontró una mayor detección de la proteína soluble por ELISA, cuando los sobrenadantes eran tratados con detergentes. Este hecho ha llevado a postular que una posible vía de liberación de esta PCT se encuentra asociada con la conformación de estructuras vesiculares denominadas exosomas (Bausero et ál., 2005; Clayton et ál., 2005; Gastpar et ál., 2005). Los exosomas son estructuras a las que se les ha atribuido una actividad inmunomoduladora muy importante, especialmente en el modelo de la inmunidad antitumoral (They et ál., 2002).

6.7. Asociación de PCT a virus:

La expresión de PCT podría constituirse en una clara respuesta al estrés celular ocasionado por la infección viral. Se ha descrito que linfocitos de pacientes infectados con VIH tienen una respuesta incrementada al estrés térmico (medida por la expresión de Hsp70) respecto a los individuos controles sanos (Agnew et ál., 2003). De igual forma, se ha encontrado que células de ratones infectadas con el virus vaccinia presentan una expresión incrementada de HSP70 (Sedger y Ruby, 1994). Entonces, podría proponerse que algunos eventos de infección viral generan una respuesta típica al estrés por calor reflejada en el incremento de algunas PCT. Estas PCT, expresadas de forma constitutiva por las células o inducidas durante la infección, podrían ser partes activas del ciclo replicativo viral y/o actuar como inmunomoduladores.

La participación de las PCT durante la infección viral se ha descrito en diferentes modelos y niveles. Por ejemplo, durante la infección por RV la HSC70 participa durante la entrada viral, quizás a través de un evento de pos-adsorción mediando la unión del virus a la célula a través de la proteína VP5* (proteína viral producto del clivaje de VP4

por tripsina). Esta HSC70 al parecer estaría haciendo parte de un microdominio del tipo “raft” en conjunto con otras moléculas receptoras de RV como el gangliosido GM1, y las subunidades de integrinas $\alpha 2$ y $\beta 3$ (Guerrero et ál., 2002; Isa et ál., 2004; Zarate et ál., 2003). La capacidad de las PCT para interactuar con otras proteínas, favoreciendo el plegamiento correcto de proteínas o su transporte a través de compartimentos subcelulares (función chaperona), puede constituir otro nivel de interacción entre PCT-virus. De esta forma, se ha descrito que la HSC70 al interactuar con la proteína VP1 del virus de poliooma puede mediar tanto la localización nuclear como el ensamblaje correcto de las cápsides virales (Chromy, Pipas, y Garcea, 2003).

Teniendo en cuenta el papel de las PCT como moléculas inmunomoduladoras de la respuesta inmune antitumoral, queda abierta la inquietud si durante la infección viral estas moléculas podrían jugar algún papel similar. Usando un sistema de antígenos tanto virales como no virales, se ha demostrado que ratones *Hsf-1-/-* (“heat shock factor 1”), los cuales no expresan niveles normales de HSP70 y HSP90, presentan una disminución clara en el fenómeno de “cross-priming” a LT CD8⁺ (Zheng y Li, 2004). Este hecho insinúa un posible papel de estas PCT durante la infección por microorganismos intracelulares. Otros grupos han tratado de abordar este tema inmunizando ratones con complejos HSP70-péptidos de virus herpes simple. Aunque se produce una respuesta clásica de LT citotóxicos, esta es inferior a la obtenida con el uso de minigenes de expresión de estos péptidos virales o a virus herpes simple inactivado por UV (Kumaraguru et ál., 2002). Es posible que además de las moléculas HSP70 *per se*, se requieran de otro tipo de señales derivadas de las células que expresan las proteínas virales. O que quizás las PCT derivadas de las células infectadas hagan parte de estructuras complejas, como los exosomas, con una mayor actividad inmunomoduladora.

6.8. Generalidades de las VM

Desde hace varias décadas en la literatura científica se han venido describiendo la liberación de distintos tipos de VM a partir de diferentes fuentes celulares. Sin embargo, recientemente, con la caracterización de diferentes modelos, las VM se han ido consolidando cada vez como estructuras biológicamente funcionales y no como artefactos (Cocucci, Racchetti, y Meldolesi, 2009). Entre las VM estudiadas se encuentran los exosomas, que son de origen endocítico a partir de cuerpos multivesiculares; los cuerpos

apoptóticos, producto de la muerte por apoptosis; y otros como las micropartículas, microvesículas, ectosomas y exovesículas generadas por desprendimiento regulado de la membrana plasmática (Thery, Ostrowski, y Segura, 2009). Se han reportado diferentes protocolos de purificación para estudiar las distintas VM y para su caracterización se usan varios marcadores, escogidos dependiendo del origen de cada vesícula. Debido a las estrategias experimentales para obtener estas VM, es muy probable que haya algún grado de contaminación entre diferentes tipos de VM, lo cual crea confusión.

La caracterización de VM como los exosomas se ha desarrollado a través de diferentes estrategias: i. Usando microscopía electrónica se han encontrado que los exosomas tienen una morfología típica en forma de copa (“cup shaped”) y un tamaño entre 50 a 100 nm a diferencia de vesículas como los cuerpos apoptóticos con una morfología bastante heterogénea y tamaños entre 50 a 500 nm (Thery, Ostrowski, y Segura, 2009). ii. A través de la flotación sobre un gradiente lineal de sacarosa se ha identificado que los exosomas se ubican típicamente entre las fracciones 1,14-1,18 g/mL (Raposo et ál., 1996), mientras que los cuerpos apoptóticos tienen una flotación principalmente en fracciones mayores a 1,24 g/mL (Thery et ál., 2001). iii. En la caracterización bioquímica desarrollada básicamente con análisis proteómicos, se han identificado una buena cantidad de proteínas con diferentes tipos de funciones: proteínas asociadas con el transporte y fusión de membranas (Rab, anexinas, flotilina), y con la biogénesis de cuerpos multivesiculares (Tsg101) reflejando el origen endosomal de los exosomas, proteínas con procesos que requieren PCT (HSC70, HSP70 y HSP90), proteínas asociadas con la presentación antigénica como CMH-II, CMH-I y CD86. De igual forma proteínas asociadas con la adhesión celular como MFG-E8 (lactaderina), algunas integrinas y tetraspaninas (CD63, CD9, CD81 y CD82) (Thery et ál., 2001; Simons y Raposo, 2009). Dentro de esta caracterización protéica se ha observado que los exosomas carecen de proteínas de origen mitocondrial, derivadas del retículo endoplasmático o del núcleo (Bausero et ál., 2005; Thery et ál., 2001; Gastpar et ál., 2005). Se ha observado que algunos de estos últimos marcadores se pueden encontrar presentes en cuerpos apoptóticos, como son las proteínas nucleares histonas (Schiller et ál., 2008; Thery et ál., 2001).

6.9. Las VM y las infecciones virales

En algunos trabajos se ha observado que durante la infección viral se pueden generar VM

de tipo exosoma. Se ha propuesto que el VIH y el virus de hepatitis C podrían utilizar la maquinaria de producción de vesículas de las células para inducir la liberación del virus asociadas a VM y de alguna forma favorecer la dispersión viral y evadir la respuesta inmune (hipótesis del “caballo de Troya”) (Masciopinto et ál., 2004; Nguyen et ál., 2003). Dentro de los mecanismos a través de los cuales se puede dar la evasión de la respuesta inmune se encuentra la inmunosupresión de LT; se ha mostrado que exosomas derivados de células tumorales positivas para el virus de Epstein-Barr pueden expresar la proteína viral LMP-1 y mediante esta proteína ejercer un efecto inhibitor de la proliferación de LT (Keryer-Bibens et ál., 2006). Las VM producidas durante la infección viral también pueden expresar moléculas de origen no viral responsables de estas actividades inmunomoduladores. En individuos infectados con VIH se ha encontrado que VM del tipo micropartículas presentes en el plasma expresan moléculas como TRAIL, Fas-L, y TNFR-2. Se describió que durante la fase de establecimiento de la viremia en plasma, los niveles de TRAIL en las micropartículas son elevados, y por lo tanto, esta molécula podría ser responsable de la iniciación o la amplificación de la muerte celular inducida por HIV (Gasper-Smith et ál., 2008).

6.10. VM como inmunomoduladores de la respuesta inmune y de la tolerancia oral:

La función de los exosomas está en parte asociada con la célula de la cual provienen: exosomas producidos por células con capacidad presentadora de antígeno, como LB o células dendríticas, pueden favorecer la transferencia antigénica y la estimulación específica de LT. Exosomas derivados de células tumorales pueden favorecer, por un lado la transferencia antigénica cuando son capturados por células dendríticas (Andre et ál., 2002), pero cuando actúan directamente sobre los LT pueden mediar respuestas antiproliferativas (Clayton et ál., 2007) o inductoras de apoptosis (Huber et ál., 2005). Este último ha sido propuesto como un mecanismo de evasión de la respuesta antitumoral. Las funciones de estos exosomas también podrían depender del tejido donde son producidos. Por ejemplo, al inyectar por vía sistémica exosomas obtenidos *in vivo* de timo de ratón se pueden inducir LTreg Foxp3+ en pulmón e hígado. La inducción de estos LTreg por los exosomas es dependiente de su contenido de TGF- β 1 (Wang et ál., 2008). En otro modelo, VM con tamaño menor a 100 μ M, que expresan CD63 y son producidas por células del epitelio ciliar ocular, un órgano inmunológicamente privilegiado (tolerogénico), expresan Fas-L, por lo tanto tendrían la capacidad de inhibir

la función de LT (McKechnie et ál., 2006). A nivel del intestino se ha mostrado que *in vitro*, en líneas de CEI (Mallegol et ál., 2007; van Niel et ál., 2001), e *in vivo* los enterocitos parecen secretar exosomas fisiológicamente (Buning et ál., 2008). Más aún, algunos autores han propuesto que VM producidas por enterocitos les permiten a estos comunicarse con el sistema inmune y mediar mecanismos de tolerancia oral (tolerosomas) (Almqvist et ál., 2008; Karlsson et ál., 2001; Ostman, Taube, y Telemo, 2005). Es importante anotar que en la tolerancia oral juegan un papel muy importante el TGF- β y los LTreg (Strober, 2008). Sin embargo, en otros modelos que han investigado los exosomas intestinales se les han propuesto más bien funciones inmunoestimulantes (Mallegol et ál., 2007; Van Niel et ál., 2003). Por lo anterior, es claro que estas VM intestinales pueden cumplir diversas funciones y, por lo tanto deberían estudiarse las funciones en el contexto de cada modelo, como por ejemplo el desarrollado en este trabajo durante la interacción con el RV.

7. METODOLOGIA

7.1. Sujetos y colección de las muestras:

En este estudio participaron 36 niños con GE del servicio de urgencias de pediatría del hospital San Ignació en Bogotá, Colombia, así como varios adultos voluntarios. Los padres/responsables de los niños y los voluntarios firmaron un consentimiento aprobado por el comité de ética de la facultad de medicina de la Pontificia Universidad Javeriana. Las muestras de sangre de los niños para obtener plasma y las muestras de materias fecal colectadas se conservaron a -70°C hasta su uso. El antígeno en materias fecales y plasma, así como la IgA específica de RV en plasma se medieron por ELISA (Jaimes et ál., 2002).

7.2. Cultivo células Caco-2:

Las células Caco-2 (un regalo de C. Sapin INSERM U 538, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France) se cultivaron en medio completo (DMEM suplementado con 20% de SFB inactivado por calor, 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ciprofloxacina, 2mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES y 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (Invitrogen-Gibco)). Las células se usaron entre el pasaje 68 a 77. En algunos experimentos las células se cultivaron en sistemas *Transwell* (filtros de membrana tratados con policarbonato de 24 mm y con poros de 3.0 μm , Costar, Corning incorporated, Corning, NY) durante 21 días para su diferenciación espontánea antes de la infección. Para las preparaciones de las fracciones enriquecidas en VM las células se cultivaron en frascos T75 o T175 y se cultivaron durante 15 días antes de la infección en medio completo.

7.3. Infección por RV de las células Caco-2:

La cepa de RV (RRV) se creció y título sobre células MA104 (Narvaez, Angel, y Franco, 2005). En algunos experimentos las células se infectaron con partículas virales purificadas de triple capa ó TLPs. Mientras que en otros se uso un lisado de células MA104 infectadas como fuente de RRV. Como controles negativos se usaron el dializado de las TLPs ó el lisado de células MA104 tratadas con un control negativo mock. Para la infección, el RRV se activo por 30' por tratamiento con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tripsina. Las monocapas se lavaron 3 veces con DMEM sin SFB y se uso un inculo viral a una

multiplicidad de infección (MOI) de 5 UFF/célula. Después de 45' el inóculo se retiró y las monocapas se lavaron dos veces con DMEM sin SFB. En seguida, DMEM nuevo sin SFB fue adicionado y se incubó por diferentes tiempos según el experimento. El efecto ocasionado por el virus se determinó a través de la medición de la resistencia transepitelial (TER) usando el aparato Millicel ERS (Millipore, Bedford, MA) y a través de la detección del marcador de pérdida de la viabilidad LDH (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

7.4. Detección de inmunomoduladores:

En los sobrenadantes tanto apicales como basales de las células infectadas con RV o tratadas con mock en los sistemas Transwell se analizó la presencia de las proteínas HSC70 y HSP70 por WB (ver abajo) y ELISA, respectivamente. Para la ELISA se usó el estuche comercial EKS700 (StressGen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada; límite de detección 0,78 ng/mL). Por otro lado, se cuantificó a la citocina TGF- β 1 total (la forma activa más la forma latente) a través de la prueba de ELISA Duoset (R&D Systems; límite de detección 31,2 pg/mL). Estos mismos inmunomoduladores se detectaron en la fracción F3 concentrada por ultracentrifugación (ver abajo).

7.5. Preparación de una fracción que contiene VM:

Para obtener una fracción que contiene VM, se usó un método que ha sido descrito para aislar exosomas (Thery et ál., 2001), con algunas pequeñas modificaciones. Se colectaron los sobrenadantes de las células Caco-2 a diferentes tiempos después de la infección con RRV o el tratamiento con el control mock y se filtraron a través de 0,22 μ m (fracción 1 [F1]). Los sobrenadantes filtrados se ultracentrifugaron a 100.000 x g en un rotor 70 Ti (Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA) por 90 minutos. Se colectaron los sobrenadantes (Fracción 1 [F2]) y los precipitados se resuspendieron en PBS pH 7,4 y se ultracentrifugaron de nuevo a 100.000 x g por 90 minutos. Los precipitados finales se resuspendieron en PBS (fracción 3 [F3]), en un volumen correspondiente a 1/200 del volumen de la F2. Todas las fracciones se analizaron por WB como se describe abajo. Las F3 de las células infectadas por RV se titularon sobre células MA104 y una preparación control que contiene la misma cantidad de RRV purificado se usó en algunos experimentos. Una preparación similar a la F3 de las células Caco-2 se preparó a partir de suspensiones de materias fecales al 10% en PBS de niños con GE. Las suspensiones de

materia fecal se centrifugaron a 8000 x g y luego se filtraron a través de filtros de 0,22 µm, para luego ser ultracentrifugadas a 100.000 x g por 90 minutos. Los precipitados se resuspendieron en PBS y a las F3 preparadas de esta forma se les analizó la presencia de CD63 por WB. Las muestras de materia fecal con niveles relativamente altos de CD63 fueron sometidas a inmunoprecipitación, como se describe abajo.

Para comparar las F3 liberadas de células Caco-2 infectadas o no con RV se usaron volúmenes idénticos de las preparaciones, esto con el fin de hacer una cuantificación relativa de los marcadores de exosomas CD63 y la actividad AChE. En los estudios funcionales se determinó la cantidad de las proteínas presentes en la F3 por Bradford y cantidades de F3 que contienen la misma cantidad de proteína se usaron para la comparación entre células infectadas y no infectadas. En otros experimentos la cantidad de AChE se cuantificó en las F3 y cantidades de F3 que contienen la misma cantidad de AChE se usó para la comparación. Esta última estrategia permite una comparación más precisa de VM en las F3 de células infectadas y no infectadas, si se tiene en cuenta que en las F3 de las células infectadas las partículas virales presentes incrementan el contenido relativo de proteínas.

7.6. Inmunoprecipitación de vesículas que expresan CD63:

Para la inmunoprecipitación se tomaron perlas magnéticas M-450 acopladas con anticuerpos de oveja anti-IgG de ratón (DynaL-Biotech ASA, Oslo, Norway) y se incubaron toda la noche con un anticuerpo monoclonal anti-CD63 (Clone H5C6, BD Pharmingen, San Diego, CA) o un anticuerpo monoclonal control de isotipo (Clone MOPC-21, BD Pharmingen, San Diego, CA) (Clayton et al., 2005). Las perlas magnéticas se lavaron dos veces con una solución de PBS y albúmina sérica bovina al 0.1%. En seguida, se mezclaron 25 µl de F3 con las perlas y se incubaron con agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la separación magnética los sobrenadantes con las proteínas “libres” no unidas se colectaron, y las perlas magnéticas se lavaron seis veces con la solución de PBS y albúmina sérica bovina. Tanto las proteínas libres como las unidas a las perlas se resuspendieron en buffer Laemmli no reductor y reductor (DTT) y se evaluaron por WB.

Para las preparaciones de materias fecales, la IP fue llevada a cabo de la misma forma

que para las de sobrenadantes de cultivo, con la diferencia que las perlas se incubaron con las muestras toda la noche. La evaluación de la presencia de la proteína VP6 en las proteínas inmunoprecipitadas se evaluó por WB y/o por ELISA. Cuando se usó este último método, las perlas se trataron con deoxicolato (0,1% durante 1 h a temperatura ambiente), para poder solubilizar las VM (MacKay et ál., 2006). La ELISA se desarrolló como se ha descrito para detectar antígeno de RV (Jaimes et ál., 2002), pero cubriendo inicialmente la placa con el anticuerpo monoclonal 1026 anti-VP6.

7.7. Flotación de las VM sobre un gradiente de sacarosa:

La flotación de las vesículas liberadas por las células Caco-2 sobre un gradiente continuo de sacarosa se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Raposo et ál., 1996). Las F3 se resuspendieron en 3 ml de una solución 2,5 M de sacarosa en un buffer HEPES 20 mM/NaOH, pH 7,2. Un gradiente de sacarosa (2,0-2,5 M de sacarosa, HEPES 20 mM/NaOH, pH 7,2) se colocó sobre la suspensión de VM en un tubo de ultracentrífuga. Las muestras se ultracentrifugaron a 100.000 x g por 15 h (rotor SW41, Beckman Instruments, Inc. En seguida, fracciones de 1 mL se colectaron desde el fondo del tubo. La densidad de cada fracción se determinó usando un refractómetro (ausJENA, Jena, Germany). Las fracciones se diluyeron con grandes volúmenes de PBS y se ultracentrifugaron a 100.000 x g (SW41 rotor, Beckman Instruments, Inc). Los precipitados se resuspendieron en PBS y luego en buffer Laemmli reductor y no reductor para el análisis por WB.

7.8. Western Blots:

Los WB se llevaron a cabo como se describió previamente (Barreto et ál., 2003), con algunas modificaciones menores. Todas las muestras se resuspendieron en buffer Laemmli reductor (0.1 M de DTT) y se evaluaron por WB, excepto para la identificación de CD63 en las muestras, las cuales se prepararon en buffer Laemmli no reductor (sin DTT) (van Niel et ál., 2001). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE (geles al 10%) y se transfirieron a membranas de PVDF (Biorad, Hercules, CA). Las membranas se bloquearon por 1 hora con una solución Tris-HCL (pH 7,5) que contiene leche descremada al 5% y 0,05% de Tween 20. Luego, las membranas se incubaron con anticuerpos primarios apropiadamente titulados (AcMo de ratón anti-HSC70, clon B-6 de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; AcMo de ratón anti-HSP70, clon C92F3A-5

de StressGen Biotechnologies Victoria, Canada; AcMo de ratón anti-CD63, clon H6C6 de BD Pharmingen, San Diego, CA; anticuerpo policlonal anti-MFG-8 hecho en conejo, SC-33545 de Santa Cruz Biotechnology; anticuerpo policlonal anti-calnexina hecho en conejo, SPA-860 de Stressgen Biotechnologies; AcMo de ratón anti-RV VP6, clon 1026, un generoso regalo de E. Kohli, Université de Dijon, Dijon, France). Después del lavado, las membranas se incubaron por 50 minutos con anticuerpos policlonales hechos en cabra contra IgG de ratón o de conejo y conjugados con peroxidasa (Immunopure, Pierce Biotechnology, Inc, Rockford, IL). Finalmente, las membranas se revelaron usando el sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura Extended Duration (Pierce Biotechnology) y la señal se capturó a través de películas CL-Xposure (Pierce Biotechnology, Inc, Rockford, IL). Como un control positivo para la detección de la proteína HSC70 se usó la proteína recombinante bovina HSC70 (SPP-751) de Stressgen Biotechnologies. Es importante resaltar que el AcMo disponible para identificar la proteína CD63 solamente reconoce la forma no reducida de la proteína, produciendo una banda difuminada y alargada verticalmente (van Niel et ál., 2001).

7.9. Análisis de la proliferación y viabilidad de los LT:

Para evaluar la función de los LT en presencia de las VM, inicialmente se purificaron los LT CD4⁺ por selección negativa (Miltenyi Biotech) a partir de CMSP de donantes sanos aislados por gradientes de Ficoll-Hypaque. La pureza de los LT CD4⁺ (> a 86%) se determinó por citometría de flujo. Suspensiones de células de LT CD4⁺ (5x10⁶/ml) se marcaron con 2 µM de CFSE (Molecular Probes, Lelden, OR, USA) por 8 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con RPMI 1640 que contiene suero humano AB al 10%. Para la estimulación se tomaron poblaciones de 1x10⁶ LT CD4⁺ marcados con CFSE y se expusieron a un estímulo policlonal consistente de 1,25 µg/ml del superantígeno enterotoxina B de *Staphylococcus sp* (SEB, Sigma) junto con 0,5 µg/ml de AcMo anti-CD28 y de anti-CD49d (Pharmingen, San Diego, USA.). Simultáneamente, los LT fueron tratados o no con diferentes cantidades de preparaciones F3. Células no estimuladas o estimuladas policlonalmente y tratadas junto con RRV purificado a través de un gradiente de cloruro de cesio (TLPs) fueron usadas como control. Después de 5 días, los LT se tiñeron con la tinción LIVE/DEAD Violet Viability (Invitrogen) de acuerdo al protocolo de la casa comercial (Perfetto et al., 2006) y con el AcMo anti-CD4 PercP Cy5.5 (Pharmingen). Cerca de 10⁵ células se adquirieron usando el

citómetro de flujo FACSaria I (Beckton Dickenson) y los análisis se hicieron en el Software FlowJo. Se determinó tanto el porcentaje de células viables (baja tinción violeta) y no viables (alta tinción violeta), y sobre las células viables se determinó el porcentaje de LT en proliferación de acuerdo a la disminución del marcador CFSE. En algunos experimentos, los LT CD4⁺ se trataron con 10 μ M del inhibidor del receptor de TGF- β (ALK5i, SB431542, Sigma) por 30 minutos a 37°C antes de la estimulación.

7.10. Determinación de la actividad AChE:

Para la determinación de la actividad AChE, los sobrenadantes apicales y basales de los cultivos de Caco-2 en los sistemas Transwell infectados o tratados con el control mock se ultracentrifugaron por 90 minutos a 100.000 xg. Los precipitados se resuspendieron en PBS y la actividad enzimática se determinó usando el estuche comercial AMPLEX RED (Invitrogen, Eugene, Colorado-USA), siguiendo el protocolo de la casa comercial. Las muestras fueron leídas en un fluorómetro TECAN (Tecan GENios, Phenix Research Products, Hayward, CA). La actividad AChE presente en las fracciones F3 y en las fracciones 1.10-1.18 g/ml y > 1.24 g/ml se determinó usando el mismo sistema. El límite de detección fue de 2 mU/ml de actividad enzimática.

7.11. Microscopía de fluorescencia:

Las células Caco-2 se cultivaron en filtros con un poro de 0,4 μ m (Transwell filters; Costar, Corning incorporated, Corning, NY) a una densidad de 10⁵ células/cm² y con recambio de medio completo día de por medio durante 7 días, y luego diariamente hasta llegar al día 21. La integridad de la monocapa se verificó midiendo la TER (Millicell, Millipore, Bedford, MA). Las células polarizadas infectadas por 16 h con RRV a una MOI de 10 se fijaron con una solución de paraformaldehído al 2% en PBS 100 mM (pH 7,4) por 15 minutos y se permeabilizaron en una solución de 1 % de saponina y 3% de albúmina sérica bovina en PBS. En seguida, las células se incubaron con una dilución 1/2000 del AcMo 1E11 anti VP6, y diluciones 1/100 de los anticuerpos policlonales anti-CD63 (LAMP-3, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) o anti-EEA-1 hechos en conejo (Early endosome antigen 1, Abcam, Cambridge, UK). Posteriormente, las células se incubaron con diluciones 1/250 de los anticuerpos secundarios anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 647 y anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Eugene, Colorado, USA) y con una dilución 1/20 de la sonda de actina faloidina Alexa Fluor 594

(Invitrogen, Eugene, Colorado, USA). Finalmente, las muestras se montaron usando el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal (LSM510, Zeiss, Jena, Germany) usando secciones en Z de 0.2 μm para poder hacer las reconstrucciones en tres dimensiones con el Software Volocity (Improvision, PerkinElmer Company, Coventry, England). En algunos experimentos se usaron anticuerpos policlonales de conejo contra las proteínas CD26 y CD9 (SC-9153 and SC-9148, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

7.12. Microscopia electrónica:

Las F3 de las células Caco-2 infectadas con RRV o tratadas con el control mock se estudiaron por microscopia electrónica. Las muestras se resuspendieron en paraformaldehído al 4% y se colocaron sobre rejillas para microscopia electrónica cubiertas con Formvar-carbon. Se usó como medio de contraste una solución de acetato de uránilo y metil-celulosa. Estas vesículas se visualizaron con un microscopio electrónico Zeiss EM 109 (Zeiss, Jena, Germany).

7.13. Análisis estadístico:

El análisis estadístico se llevo a cabo con el Software SPSS versión 12,0 (SPSS Inc., Chicago, IL) y el Software Graph Pad Prism versión 5,0 (Graph Pad Prism software Inc., San Diego, CA), usando las pruebas exactas no paramétricas de Wilcoxon y Fisher. La significancia fue establecida con $P < 0,05$. Los datos son mostrados como medianas, al menos que otra cosa se estipule.

8. RESULTADOS

8.1. Las células Caco-2 polarizadas infectadas por RV alteran la integridad de la monocapa celular y la viabilidad celular:

Se ha descrito que la infección por RV de células Caco-2 produce una liberación de partículas virales principalmente en el compartimento apical en comparación con el basal (Jourdan et ál., 1997). Acá mostramos, en las células Caco-2 en un sistema Transwell con poro de 3,0 μm , que la infección por RRV de células Caco-2 produce una liberación hacia el compartimento apical a partir de las 12 hpi (Figura 2 artículo 1 y Figura 8.1 A). En el compartimento basal las partículas virales infecciosas también se detectaron pero de una forma más retrasada, siendo bien notorio a las 48 hpi; esto podría ser atribuido a la pérdida de la integridad de la monocapa y la viabilidad celular observada desde las 16 hpi (Figuras 8.1.2. y 8.1.3.).

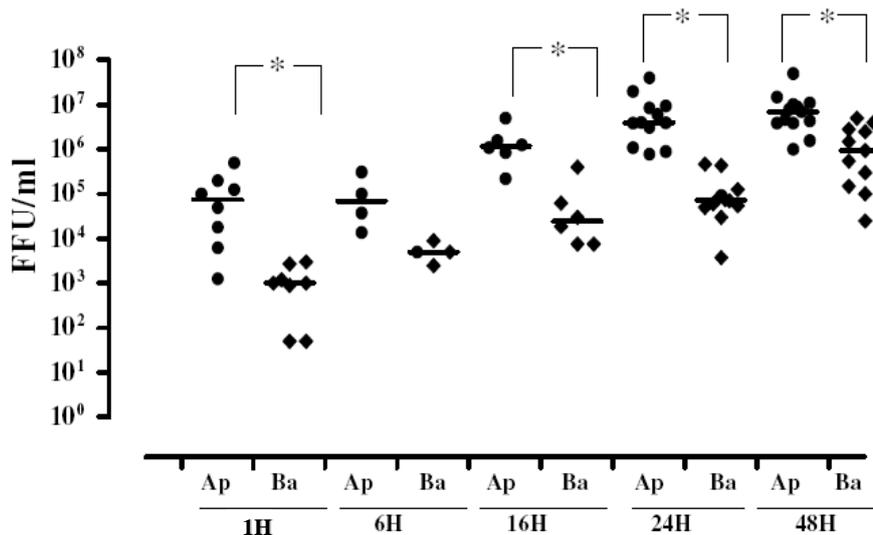


Figura 8.1.1. El RV se libera principalmente por el compartimento apical de las células Caco-2 polarizadas. Células Caco-2 cultivadas en Transwell se infectaron con RRV al día 21 y se colectaron los sobrenadantes apicales y basales en diferentes tiempos. El virus presente en los sobrenadantes se tituló sobre células MA104 y se expresó como UFF/ml.

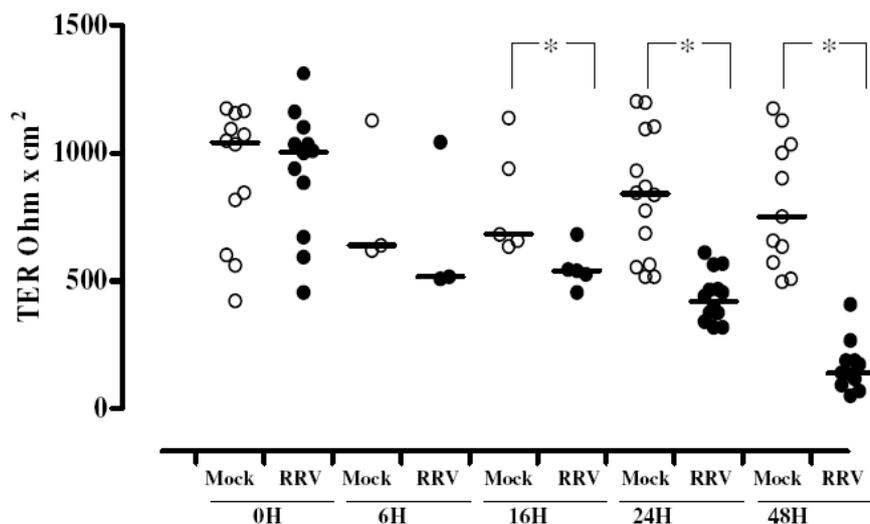


Figura 8.1.2. El RV afecta la integridad de la monocapa celular. Células Caco-2 cultivadas en Transwell se infectaron con RRV (círculos llenos) o se trataron con mock (círculos vacíos) al día 21 y se cálculo la TER en cada tiempo (Ohm/cm²).

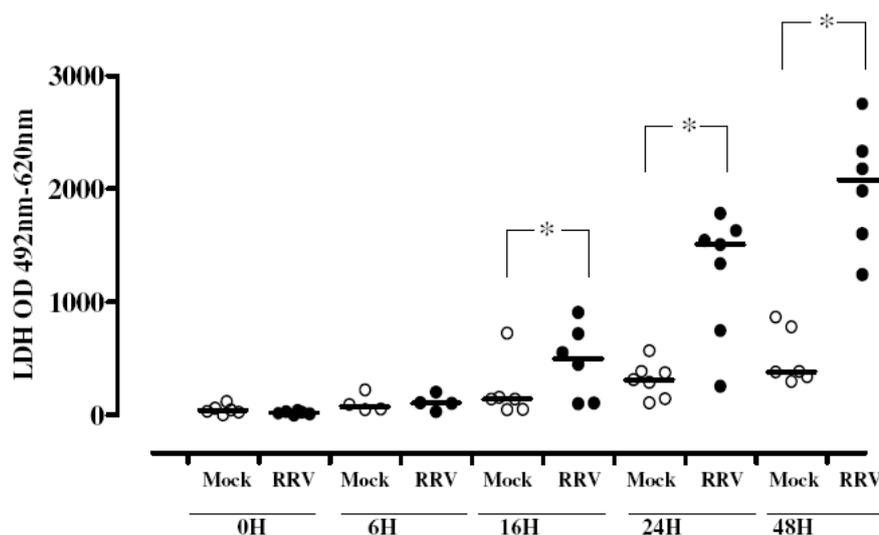


Figura 8.1.3. El RV disminuye la viabilidad celular. Células Caco-2 cultivadas en Transwell se infectaron con RRV (círculos rellenos) o se trataron con mock (círculos vacíos) al día 21 y se colectaron los sobrenadantes apicales y se les determinó la cantidad LDH presente como una medida de pérdida de la viabilidad.

8.2. Inmunomoduladores liberados por las células Caco-2 polarizadas:

Se estudió la liberación de algunos inmunomoduladores endógenos liberados durante la infección por RV de las Caco-2. Acá se muestra que durante la infección por RV de las células Caco-2 se incrementó ligeramente la detección de la citocina TGF-β1 total (activo

más latente) principalmente en el compartimento basolateral (Figura 8.2.1). El RV no indujo la liberación de TGF- β 1 activo (n=3, datos no mostrados). En los sobrenadantes de las células Caco-2 infectadas por RV no se logró detectar las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, o TNF- α , pero si se encontró IL-8 y PGE2M. Estos resultados de estas citocinas serán mostrados en otro trabajo diferente.

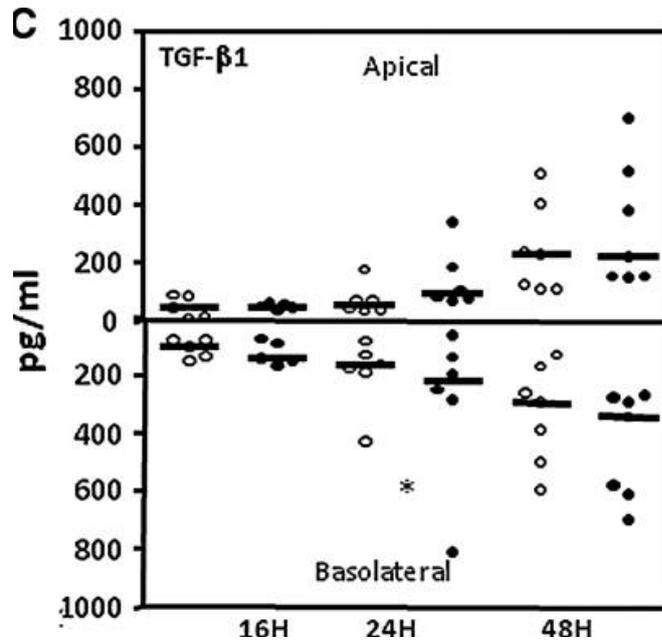


Figura 8.2.1. El RV induce liberación de TGF- β 1 por el compartimento basal. Células Caco-2 cultivadas en Transwell se infectaron con RRV (círculos rellenos) o se trataron con mock (círculos vacíos) al día 21 y se colectaron los sobrenadantes apicales y basales, y se les determinó por ELISA la presencia de TGF- β 1.

Como posibles inmunomoduladores, también se estudió en este modelo a las proteínas HSC70 y HSP70. En las células infectadas se encontró que la HSP70 a las 24 hpi se encuentra incrementada en el compartimento apical, y a las 48 hpi tanto en el compartimento apical como el basolateral (Figura 8.2.2). La proteína HSC70 fue detectada por WB en el compartimento apical a las 24 y 48 hpi, y se detectó únicamente a las 48 hpi en el compartimento basal de una forma inconsistente (1 de 3 experimentos) (Figura 8.2.3). Las dos PCT se detectaron de forma concomitante con la pérdida de la viabilidad y la integridad de la monocapa en las células infectadas. Para analizar este hecho, se detectó la HSC70 y la cantidad de LDH en los sobrenadantes de las células infectadas con las cepas humanas de RV de menor citopatogenicidad Wa e ITO en

comparación con la cepa RRV. Como se observa en la figura 8.2.4 mayores niveles de HSC70 y LDH se detectaron en los sobrenadantes de las células infectadas por RRV en comparación con las cepas humanas, sugiriendo que las liberación de las PCT va de la mano con la liberación de LDH.

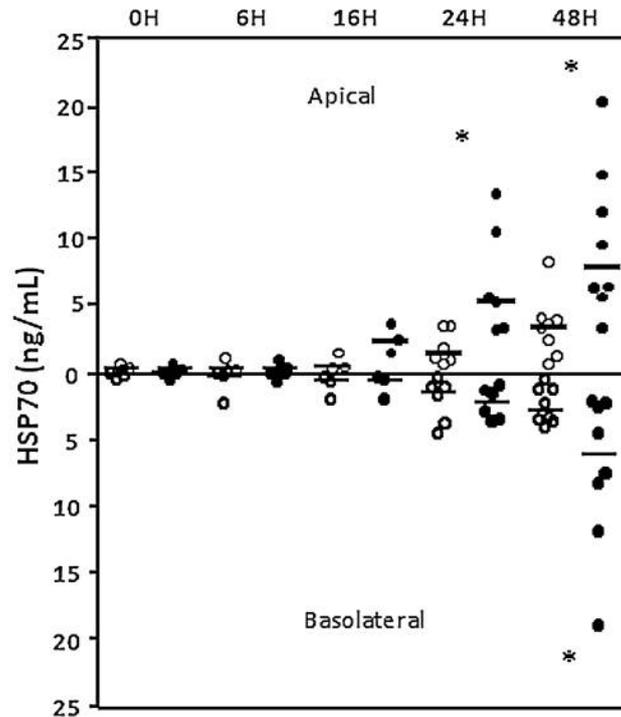


Figura 8.2.2. El RV incrementa la detección de la proteína HSP70 en el compartimento apical. Células Caco-2 cultivadas en Transwell se infectaron con RRV (círculos rellenos) o se trataron con mock (círculos vacíos) al día 21 y se colectaron los sobrenadantes apicales y basales y se les determinó por ELISA la presencia de HSP70.

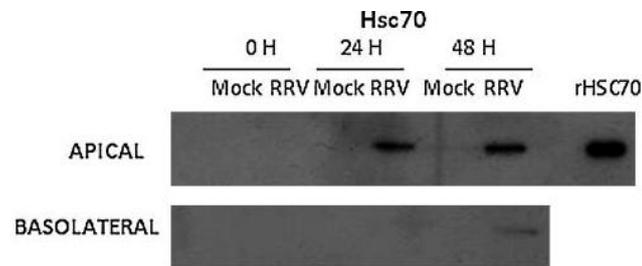


Figura 8.2.3. El RV incrementa la detección de la proteína HSC70 en el compartimento apical. Células Caco-2 cultivadas en Transwell se infectaron con RRV o se trataron con mock al día 21 y se colectaron los sobrenadantes apicales y basales, y se les determinó por WB la presencia de HSC70.

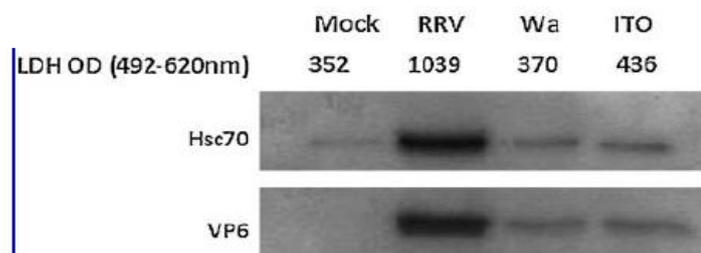


Figura 8.2.4. Cepas de RV con mayor efecto citopático generan una mayor detección de la proteína HSC70. Células Caco-2 polarizadas en T175 se infectaron con las cepas de RV RRV, Wa e ITO o se trataron con el control mock del RRV y se colectaron los sobrenadantes y se les determinó la LDH y la proteína HSC70 por WB.

8.3. La infección por RV de las células Caco-2 incrementa la liberación de PCT, TGF- β y marcadores de exosomas asociados a una fracción enriquecida con VM:

Se ha descrito que las proteínas HSC70, HSP70 y TGF- β 1 pueden ser liberadas en forma soluble o asociadas con exosomas (Clayton et ál., 2007; Clayton et ál., 2005; They et ál., 2001; They et ál., 1999). Para determinar si en nuestro modelo estas proteínas se encuentran asociadas a VM, se recuperaron los sobrenadantes (F1) de células Caco-2 24 horas después de la infección con RRV o el tratamiento con el control mock, y se ultracentrifugaron a 100.000xg por 90 minutos. Se colectaron y analizaron los sobrenadantes (que corresponden a la fracción F2, que debería contener la forma soluble de las proteínas) y los precipitados (que corresponden a la fracción F3, que potencialmente contienen las VM). Las diferentes fracciones se caracterizaron de acuerdo a los marcadores esperados en preparaciones de exosomas. En ese sentido, se detectó la presencia de los marcadores de exosomas CD63, lactaderina y la actividad AChE en la fracción F3, así como la ausencia de calnexina y la histona H2B en esta misma fracción (Figura 8.3.1 y 8.3.2). De igual forma, se detectó la proteína viral VP6 principalmente en la F3, tal como se esperaba, ya que en esta fracción precipitaron durante la ultracentrifugación las partículas virales. Las dos PCT se detectaron tanto en una forma soluble (F2) como asociada a la fracción F3, aunque de acuerdo a los volúmenes recuperados de cada fracción, la cantidad de PCT en forma soluble es mayor que la asociada a la fracción F3 (Figura 8.3.1). De igual forma, la citocina TGF- β 1 también se detectó en la fracción F3 donde se encuentran concentradas por ultracentrifugación las VM (Figura 8.3.3). Cuando se compararon idénticos volúmenes de las fracciones, la F3

de las células infectadas por RV presentó relativamente más Hsc70, CD63, actividad AChE, así como una tendencia a presentar más TGF- β 1, que la F3 de las células control no infectadas (Figuras 8.3.1, 8.3.3 y 8.3.4). Sin embargo, cuando se normalizaron los resultados del TGF- β 1 de acuerdo a la cantidad de actividad AChE, los niveles de la citocina presente en las F3 mock y RV fueron comparables (Figura 8.3.3). Los marcadores AChE y CD63 (Figura 8.3.4) se detectaron en un mayor grado en las F3 de las células infectadas por el virus en comparación con las del control mock desde las 6 hpi, tiempo en el cual la integridad de la monocapa y la viabilidad celular aún no han sido afectadas por el virus. Tomando juntos estos resultados, se propone que la infección por RV genera un incremento en la cantidad más que cambios en la calidad de las VM; y que inicialmente este sería un mecanismo activo de liberación que con el tiempo se incrementa a través de un mecanismo pasivo como consecuencia de la muerte celular.

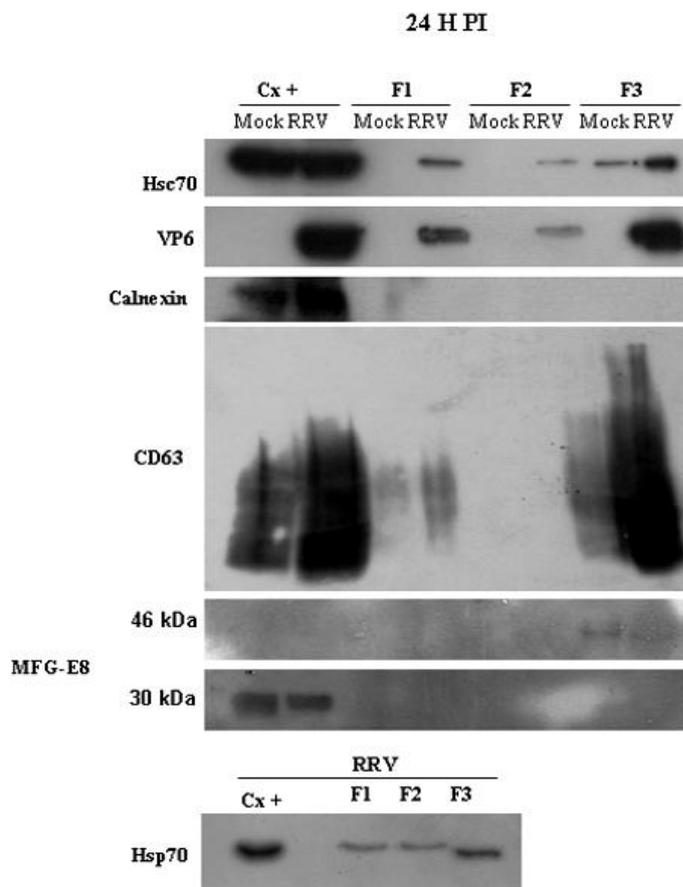


Figura 8.3.1. La infección por RV induce la liberación de PCT que precipitan junto con marcadores asociados con vesículas de membrana. Se colectaron sobrenadantes de células Caco-2 24 horas después de la infección con RRV o el tratamiento con el control

mock y se filtraron a través de 0.22 μm (F1) y se ultracentrifugaron a 100.000 x g por 90 minutos. Se colectó el sobrenadante (F2) y el precipitado se resuspendió en un volumen grande de PBS y se volvió a ultracentrifugar con las mismas condiciones. El precipitado obtenido se resuspendió y constituyó la fracción F3. En las diferentes fracciones se analizó la presencia de HSC70 , HSP70 y la proteína viral VP6 junto con la presencia de marcadores de exosomas CD63, lactaderina (MFG-E8, mostrando una banda protéica intracelular de 30 kDa y una de 46 kDa asociada a VM) y la ausencia de la proteína del retículo endoplasmático, calnexina. Como control positivo se usaron 20 μg de lisado celular y volúmenes iguales de cada fracción se resolvieron en los geles. Un experimento representativo de 5 independientes se muestra acá.

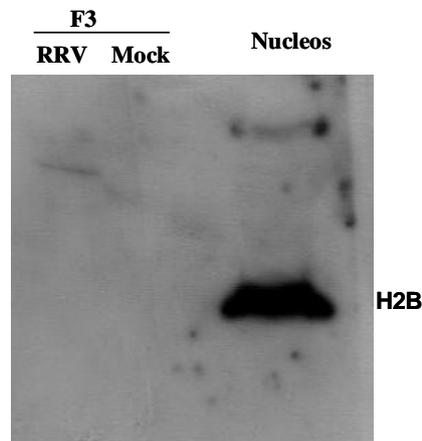


Figura 8.3.2. La histona H2B no se detectó en las preparaciones F3. Se resolvieron fracciones F3 de 24 horas de células infectadas o no con RV en geles SDS-PAGE y se desarrolló un WB con un anticuerpo específico contra la histona H2B. Como un control positivo se usó una preparación de núcleos de células Caco-2. Se muestra un WB representativo de 2 experimentos independientes.

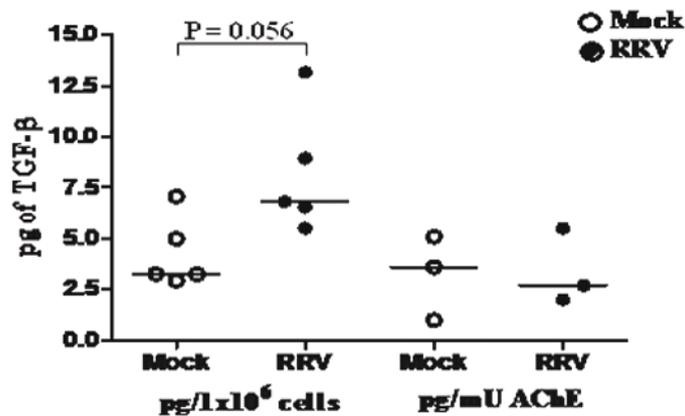


Figura 8.3.3. La infección por RV induce la liberación de TGF- β 1 asociada a la fracción F3. Se midió el TGF- β 1 por ELISA en 5 preparaciones independientes de F3. En 3 de estas preparaciones se midió simultáneamente la actividad AChE. La cantidad de TGF- β 1 se reporta de forma relativa a la cantidad de células que las producen (prueba de Mann Whitney, $p=0.056$ para la comparación entre F3 mock y RRV) o a la actividad AChE. Las barras representan medianas.

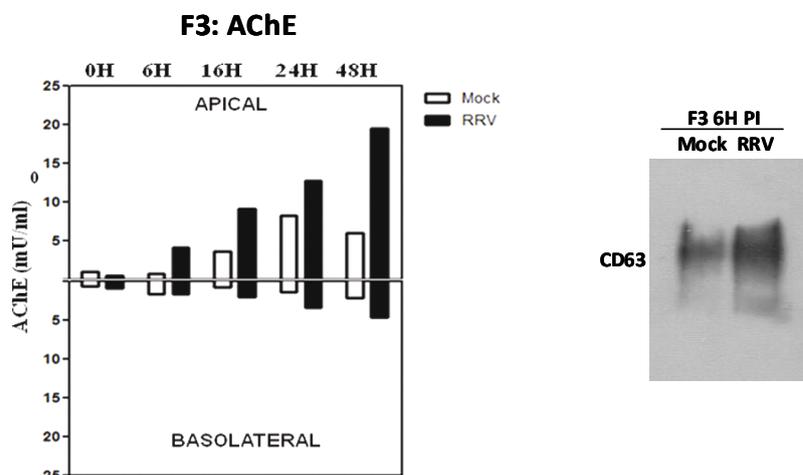


Figura 8.3.4. Los marcadores AChE y CD63 son liberados de las células infectadas por RV desde las 6 horas. Se colectaron y ultracentrifugaron los sobrendantes en diferentes tiempos post-infección de células Caco-2 cultivadas por 21 días en Transwell y expuestas a RRV o mock. Los precipitados se resuspendieron en PBS y se les midió la actividad AChE (Panel izquierda). En otros experimentos se prepararon F3 de sobrendantes después de 6 hpi con RRV o exposición al control mock y se les determinó la presencia de CD63 por WB.

8.4. La proteína viral VP6 se asocia con las vesículas que expresan CD63:

Como la mayoría de las partículas virales infecciosas y no infecciosas precipitan en la F3 de las células infectadas por el virus, se espera que todas las proteínas del RV estén presentes en esta fracción. Nuestro interés fue establecer si antígenos de RV pueden asociarse con VM y para este propósito la presencia de VP6, la proteína viral más abundante, se estudió en la F3. Para determinar si antígeno viral se encuentra asociado con VM que expresan el marcador CD63+, las F3 se inmunoprecipitaron con perlas magnéticas acopladas a AcMo contra CD63 o sus respectivos control de isotipo (Clayton et ál., 2005) Se recuperaron tanto las proteínas asociadas a las perlas como las libres y se detectó por WB la presencia de la proteína viral VP6. Se encontró que una pequeña fracción de VP6 co-inmunoprecipitó con CD63 (Figura 8.4.1). Debido a que la co-inmunoprecipitación también se observó en la F1, se concluye que esta asociación entre VP6 y las VM CD63+ no es un artefacto producto del paso de ultracentrifugación. Para evaluar la posibilidad de que el AcMo contra CD63 (clon H5C6) pudiera interactuar directamente con proteínas de RV, se mostró que este anticuerpo no reaccionaba con un lisado de células MA104 infectadas con RV, ni tampoco inmunoprecipitaba proteínas de RV cuando las perlas se ponían en contacto directo con DLPs (Figuras 8.4.2 y 8.4.3).

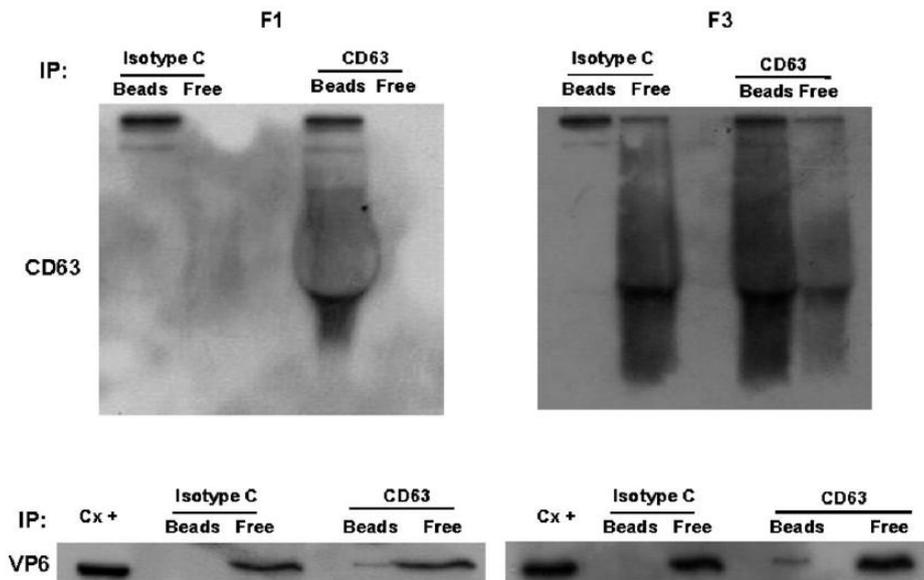


Figura 8.4.1. La proteína VP6 de RV co-inmunoprecipita con vesículas que expresan CD63. F1 y F3 producidas a partir de sobrenadantes de 24 h de células expuestas a RRV o a mock se inmunoprecipitaron con perlas magnéticas acopladas a AcMo contra CD63 o su respectivo control de isotipo. Tanto las proteínas capturadas por las perlas como las

libres se usaron para realizar WB y detectar a la tetraspanina CD63 y a la proteína viral VP6.

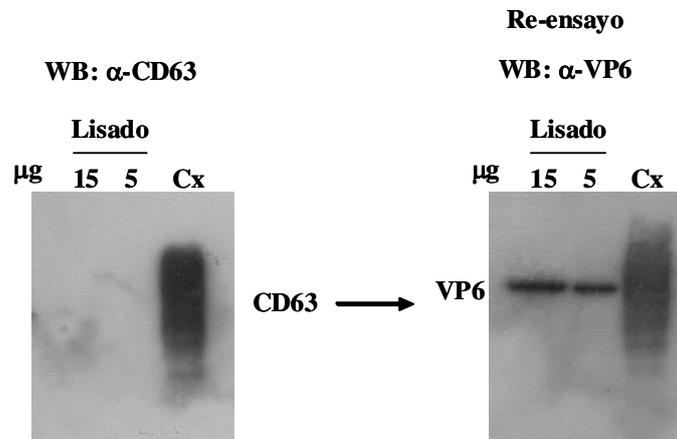


Figura 8.4.2. El AcMo α -CD63 (AcMo H5C6) no reconoce de forma inespecífica proteínas virales por WB. Se resolvieron 15 y 5 μ g de lisado de células caco-2 infectados con RRV en condiciones reductoras y se usó como un control positivo (Cx) de la proteína CD63 una preparación de VM en condiciones no-reductoras. Se realizó en un primer momento el inmunoblot con el AcMo α -CD63 (H5C6). En seguida, la membrana se lavó y se volvió a hacer un inmunoblot pero usando el AcMO (1026) específico contra la proteína VP6.



Figura 8.4.3. El AcMo α -CD63 (AcMo H5C6) no inmunoprecipita proteínas virales. Una preparación de DLPs fue inmunoprecipitada a través de perlas magnéticas acopladas al AcMo H5C6 o a su control de isotipo (IgG) correspondiente. Se recuperaron las proteínas unidas y no unidas (libres) a las perlas y se prepararon en condiciones reductoras para evaluar por inmunoblot la presencia de la proteína VP6 (AcMo 1026). Como un control positivo (Cx) de VP6 se usó un lisado de células Caco-2 infectadas con RRV.

Para estudiar si la asociación de CD63 y VP6 ocurría intracelularmente, estas dos proteínas se estudiaron por microscopia confocal en células Caco-2 infectadas. Usando

un anticuerpo policlonal contra CD63, se encontró una colocalización con VP6, especialmente en el polo apical de las células (Figura 8.4.4). Cuando se analizó la asociación de VP6 con el marcador de endosomas temprano EEA1, no se encontró alguna señal de colocalización. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la proteína viral VP6 se asocia con las VM que expresan CD63, y esta asociación ocurre intracelularmente.

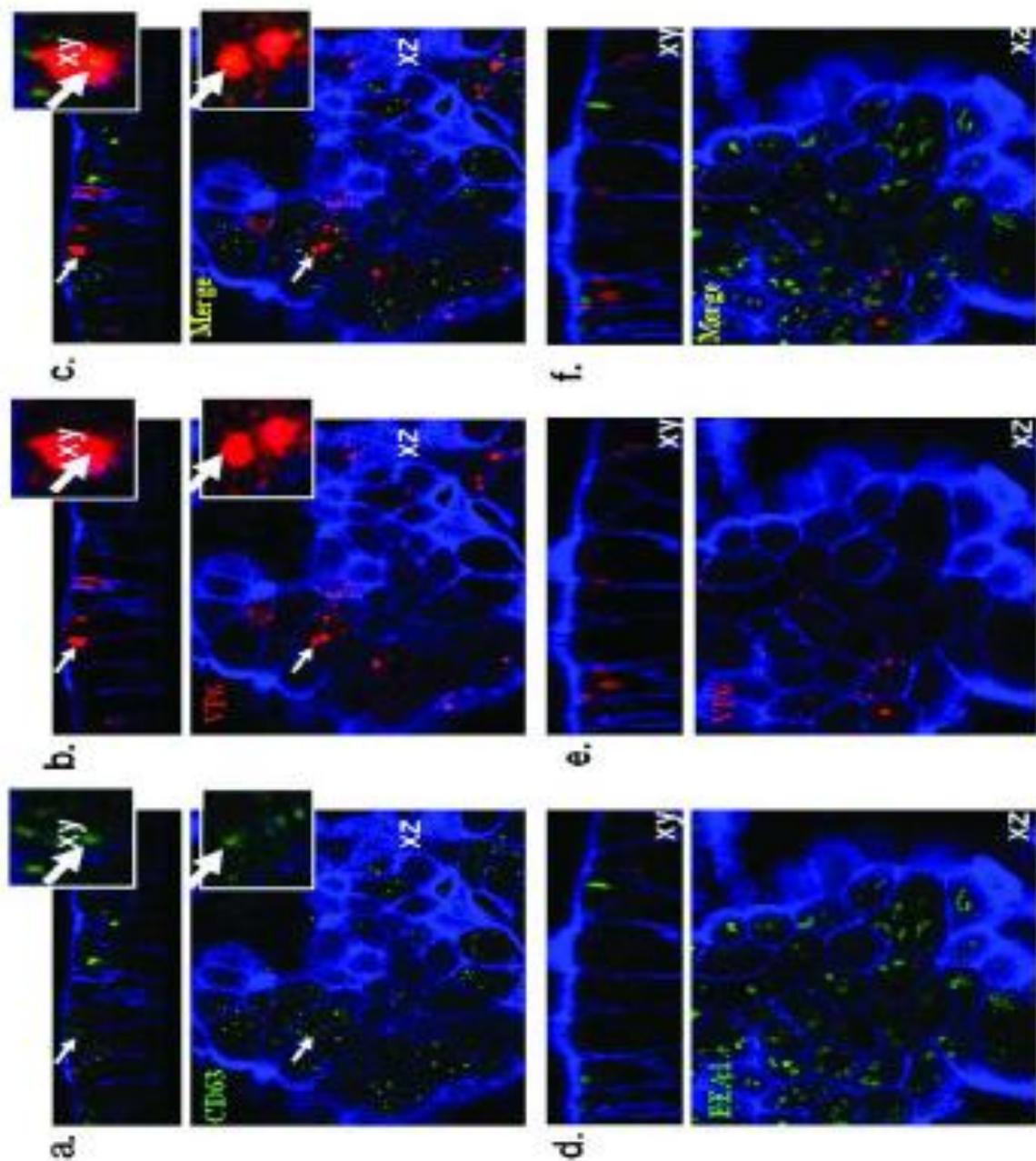


Figura 8.4.4. La proteína viral VP6 colocaliza intracelularmente con la tetraspanina CD63. Células Caco-2 cultivadas en Transwell por 21 días se infectaron con RRV por 16 horas. Se analizó por microscopia confocal la colocalización entre VP6 y CD63 (a. CD63 [verde], b. VP6 [rojo], c. Superposición), y entre VP6 y EEA1 (d. CD63 [verde], e. VP6 [rojo], f. Superposición). La tinción azul corresponde a actina (faloidina) y las flechas blancas muestran un ejemplo de colocalización, el cual es amplificado en la parte superior derecha. Cada panel está compuesto de una sección xy (arriba) y una sección xz (abajo).

8.5. La proteína de RV VP6 se asocia *in vivo* con vesículas que expresan CD63:

Los exosomas liberados por CEI han sido relativamente bien caracterizados. Para determinar si las vesículas que expresan CD63 pueden jugar un papel en GE causada por RV, se estudiaron muestras de materias fecales de niños con GE causada o no por el virus. Inicialmente se evaluó la presencia de la proteína CD63 en preparaciones de las materias fecales similares a la F3 obtenidas del sobrenadante de células Caco-2. La proteína CD63 es normalmente encontrada asociada a lípidos de membrana (Hemler, 2003) y por lo consiguiente la presencia de este marcador en muestras de materia fecal puede reflejar la liberación *in vivo* de VM CD63+. La proteína CD63 fue detectable en frecuencias similares en muestras de niños con GE debido (15/24) o no (5/12) a RV (prueba de Fisher $p=0.29$). Sin embargo, acá se propone que la diarrea en sí puede ser un inductor de la liberación de estas vesículas, ya que hubo una tendencia a detectar más frecuentemente esta proteína en muestras de niños con menos de tres días de establecimiento de la diarrea (7/8) en comparación con las provenientes de niños con 3 días ó más (13/28) (prueba de Fisher $p=0.053$). Para determinar si antígeno de RV se encuentra asociado con vesículas de membrana *in vivo*, las preparaciones F3 de las materias fecales que presentaban un alto nivel de expresión de CD63 se inmunoprecipitaron con el sistema de perlas magnéticas acopladas a AcMo contra CD63. En estos análisis, se encontró en 3/8 muestras con una inmunoprecipitación exitosa de CD63 una asociación con la proteína VP6 por WB. En una de estas muestras la co-inmunoprecipitación también fue detectada por ELISA (Figura 8.5.1). Estos resultados sugieren que la asociación CD63-VP6, observada *in vitro*, también puede ocurrir *in vivo* en el intestino durante la infección por RV

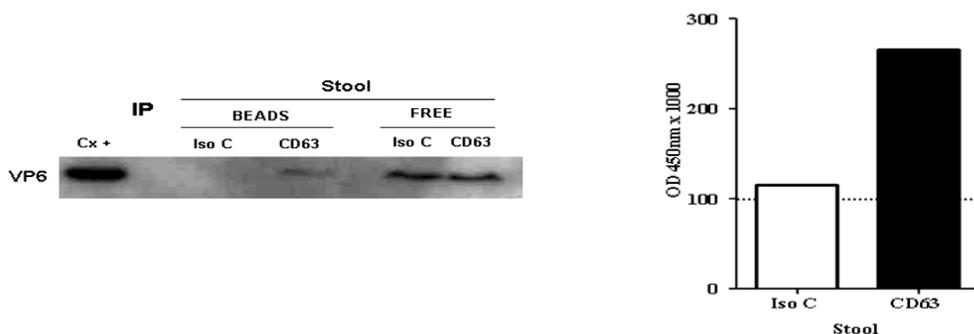


Figura 8.5.1. La proteína viral VP6 co-inmunoprecipita con la proteína CD63 en F3 de materias fecales. Se hicieron preparaciones F3 a partir de muestras de materia fecal de niños infectados con RV y se inmunoprecipitaron con perlas magnéticas acopladas a AcMo anti-CD63 o su respectivo control de isotipo. Se recuperaron tanto las proteínas capturadas por las perlas como las libres y se analizó por WB (izquierda) o ELISA la co-inmunoprecipitación de la proteína viral VP6. En la ELISA la línea punteada corresponde al punto de corte de la prueba.

8.6. Las fracciones F3 de células infectadas y no infectadas con RV inhiben la viabilidad de los LT:

Algunos trabajos han mostrado que VM derivadas de tumor pueden inducir la muerte (Huber et ál., 2005) ó inhibir la proliferación de los LT (Clayton et ál., 2007). Para determinar si las preparaciones F3 de nuestro modelo tienen estas actividades, se estableció un modelo donde LT CD4+ teñidos con CFSE se estimularon policlonalmente (SEB/ α -CD28/ α -CD49d) por 5 días en la presencia de 5 μ g de F3 provenientes de células infectadas o no con RV. Se encontró que las dos tipos de preparaciones F3, tanto las que provienen de las células infectadas como las que vienen de las células tratadas con el control mock indujeron pérdida de la viabilidad e inhibieron la proliferación de los LT (Figura 8.6.1). La F3 de las células infectadas con RRV tuvo un mayor efecto que la de las células no infectadas; esto fue claro cuando en tres de estos experimentos se compararon cantidades similares de VM (de acuerdo a la normalización con el marcador AChE) (Figura 8.6.2). Como un control del efecto directo del virus se usaron partículas virales purificadas (TLPs), las cuales no presentaron algún efecto sobre la función de los LT (datos no mostrados). Por lo tanto, el efecto sobre la viabilidad y la proliferación observado en la F3 de las células infectadas sería atribuible a las VM *per*.

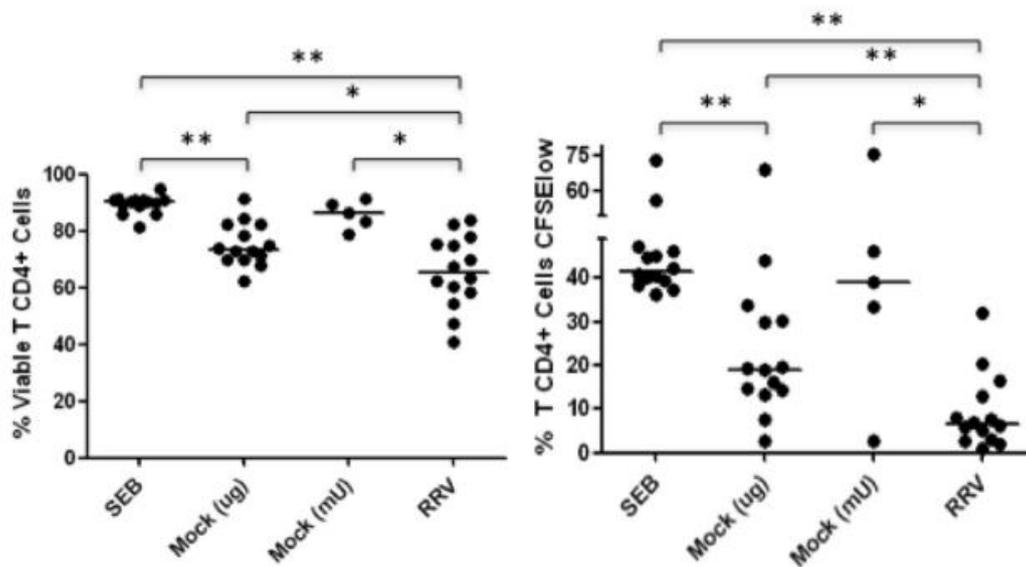


Figura 8.6.1. Las fracciones F3 de células infectadas con RV interfieren en mayor grado la función de los LT que los de células no infectadas. Poblaciones de LT CD4+ purificadas por perlas magnéticas se tiñeron con CFSE y se expusieron simultáneamente a un estímulo policlonal (SEB/ α -CD49d/ α -CD28) más 5 μ g de F3 de células infectadas con RRV o tratadas con mock. Después de 5 días de proliferación, las células se tiñeron con la tinción violeta de viabilidad y anti-CD4-PerCp-Cy5.5 y cerca de 1×10^5 células se adquirieron y analizaron con un FACS Aria. A la izquierda se muestran los porcentajes de células viables y en la parte de la derecha el porcentaje de células en proliferación de acuerdo a la disminución en CFSE. En la figura se muestran los porcentajes de 12 experimentos independientes usando 5 preparaciones diferentes de F3. Se muestran las medianas, y las diferencias significativas entre los grupos se establecieron con la prueba de Wilcoxon.

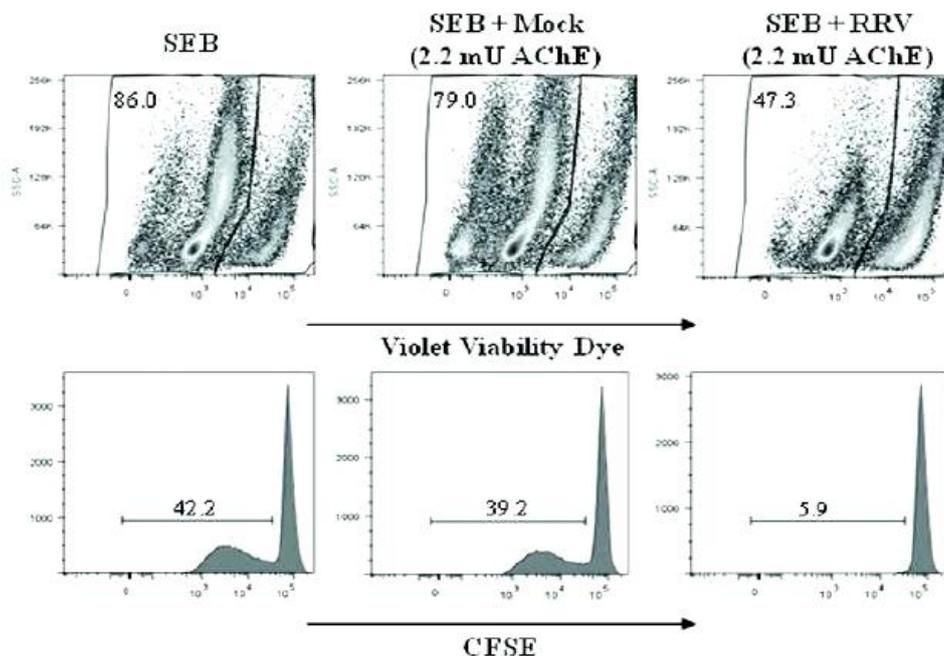


Figura 8.6.2. F3 de células infectadas con RV afectan más pronunciadamente la función de LT que las de células no infectadas. Poblaciones de LT CD4+ purificadas por perlas magnéticas se tiñeron con CFSE y se expusieron simultáneamente a un estímulo policlonal (SEB/ α -CD49d/ α -CD28) en la presencia de cantidades equivalentes de actividad AChE (2.2 mU) de F3 de células infectadas con RRV o tratadas con mock. Después de 5 días de proliferación, las células se tiñeron con la tinción violeta de viabilidad y anti-CD4-PerCp-Cy5.5 y cerca de 1×10^5 células se adquirieron y analizaron con un FACS Aria. En los paneles de arriba se señalan los porcentajes de células viables y en los de abajo las células en proliferación. Se muestra un experimento típico de 3 experimentos independientes.

En el modelo tumoral se ha observado que el efecto de las VM sobre la proliferación de los LT (Clayton et ál., 2007) se atribuye al TGF- β presente allí. Para determinar el papel del TGF- β en nuestro modelo, los LT fueron pre-tratados con el inhibidor del receptor TGF- β (ALK5i, SB431542) antes de la estimulación policlonal en presencia de las F3. En la figura 8.6.3 se muestra que en 3 de 3 experimentos la pérdida de la viabilidad y la inhibición de la proliferación de los LT CD4+ inducida por las dos preparaciones F3 (mock y RRV) fue parcialmente re-establecida en la presencia del inhibidor. Estos resultados sugieren que el TGF- β es por lo menos parcialmente involucrado en mediar tales funciones.

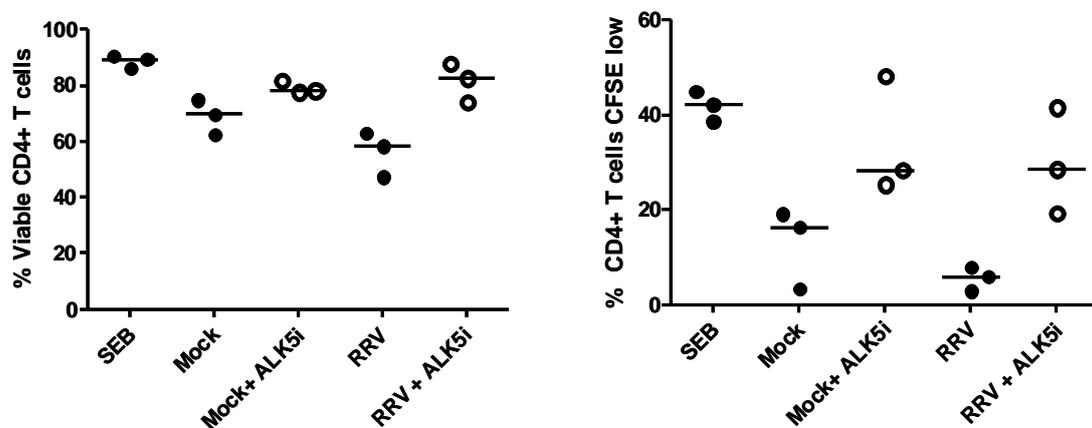


Figura 8.6.3. El TGF- β presente en las F3 media parte del efecto sobre la función de los LT. Poblaciones de LT CD4+ purificados por perlas magnéticas se tiñeron con CFSE y

se pre-trataron con el inhibidor del receptor de TGF- β (ALK5i) por 30 minutos para posteriormente exponerse simultáneamente a un estímulo policlonal (SEB/ α -CD49d/ α -CD28) en la presencia de 5 μ g de F3 de células infectadas con RV o tratadas con mock. Después de 5 días de proliferación, las células se tiñeron con la tinción violeta de viabilidad y anti-CD4-PerCp-Cy5.5 y cerca de 1×10^5 células se adquirieron y analizaron con un FACS Aria. A la izquierda se muestra el porcentaje de células viables, y a la derecha el porcentaje de células en proliferación.

8.7. Las fracciones F3 mock y RRV contienen una mezcla heterogénea de VM:

De acuerdo a algunos factores propios de nuestro modelo (el estado de diferenciación celular, la retirada del SFB y la infección viral), se espera que la preparación F3 sea una fracción heterogénea donde se encontrarían tanto exosomas como otras VM como son los cuerpos apoptóticos. Para caracterizar esta heterogeneidad, se analizó la morfología de las VM presentes en las F3 por microscopía electrónica, así como su flotación a través de un gradiente lineal de sacarosa. En las imágenes de microscopía electrónica de los dos tipos de preparaciones (mock y RRV) se encontraron tanto vesículas típicas de exosomas en forma de copa y con un tamaño entre 30 y 90 nm (They et ál., 2006), como otras con formas y tamaños irregulares (Figura 8.7.1). En los análisis usando los gradientes lineales de sacarosa, se encontró que los marcadores de exosomas usados en términos generales tuvieron una flotación como la que se ha descrito para los exosomas entre 1.10-1.18 g/ml (Raposo et ál., 1996), y otra a una mayor densidad (> 1.24 g/ml) que se ha descrito para cuerpos apoptóticos (They et ál., 2001). Este resultado se observó tanto en las fracciones de las células infectadas con el virus como las tratadas con el control mock, como en las obtenidas 12 ó 24 hpi (Figura 8.7.2).

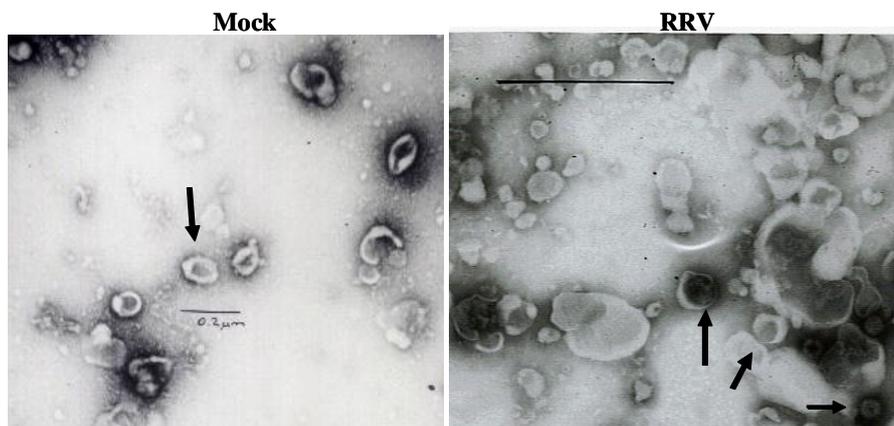


Figura 8.7.1. F3 de células infectadas con RV o tratadas con mock son morfológicamente heterogéneas. La morfología de las preparaciones F3 de células infectadas con RV o tratadas con mock durante 24 horas se examinó por microscopia electrónica. Las barras en el mock y RRV corresponden a 0.2 y 0.5 μm , respectivamente. Las flechas gruesas corresponden a VM con morfología típica de exosomas y la delgada muestra una partícula viral.

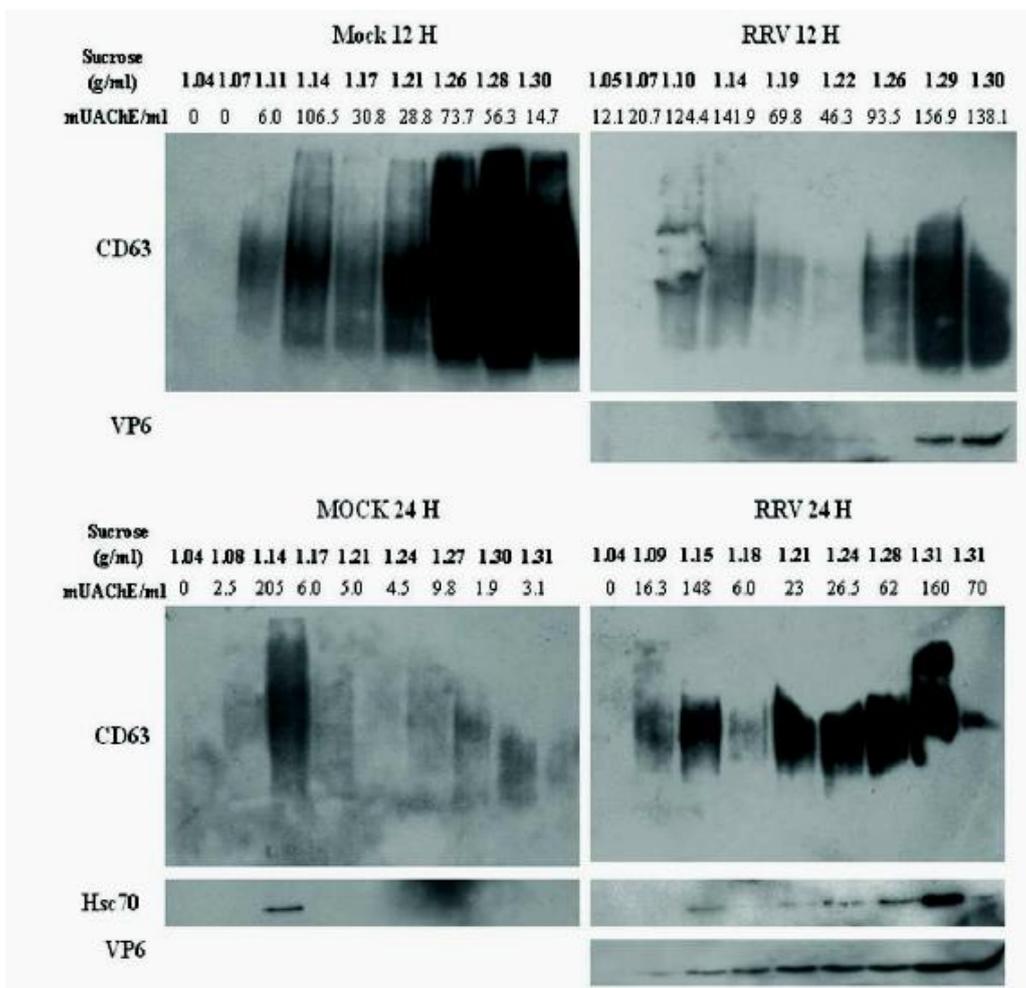


Figura 8.7.2. F3 de células infectadas con RV o tratadas son heterogéneas en cuanto a su flotación sobre un gradiente líneal de sacarosa. Preparaciones F3 de células infectadas con RV o tratadas con mock durante 12 ó 24 horas fueron ultracentrifugadas sobre un gradiente continuo de sacarosa (2.0-0.5M) a 100.000 xg por 15 horas. Se recuperaron fracciones de 1 ml y se precipitaron por ultracentrifugación. A los precipitados se les evaluó por WB la presencia de CD63, VP6 y HSC70, y se les determinó la actividad AChE como se describió en materiales y métodos. Se muestran experimentos representativos de 2 a 5 experimentos independientes con resultados similares.

Se quiso evaluar si las diferentes VM separadas por el gradiente de sacarosa tenían diferencias funcionales. Para ello, se agruparon las VM después del gradiente de sacarosa y se evaluó el efecto de diferentes cantidades de vesículas (según actividad AChE) con flotación entre 1.10-1.18 g/ml y > 1.24 g/ml sobre la función de LT. En tres experimentos independientes se encontró que las fracciones más densas (>1.24 g/ml) tenían un efecto mayor efecto sobre la viabilidad y la proliferación que la de VM entre 1.10-1.18 g/ml (Figura 8.7.3 y tabla 2 artículo 2). De igual forma se observó que los dos tipos de vesículas que provienen de las células infectadas tienen un efecto más claro sobre la función de los LT, comparada con las de las células no infectadas. Por lo consiguiente, la infección por RV produce diferencialmente exosomas y vesículas más densas con una mayor capacidad inhibitoria de células T.

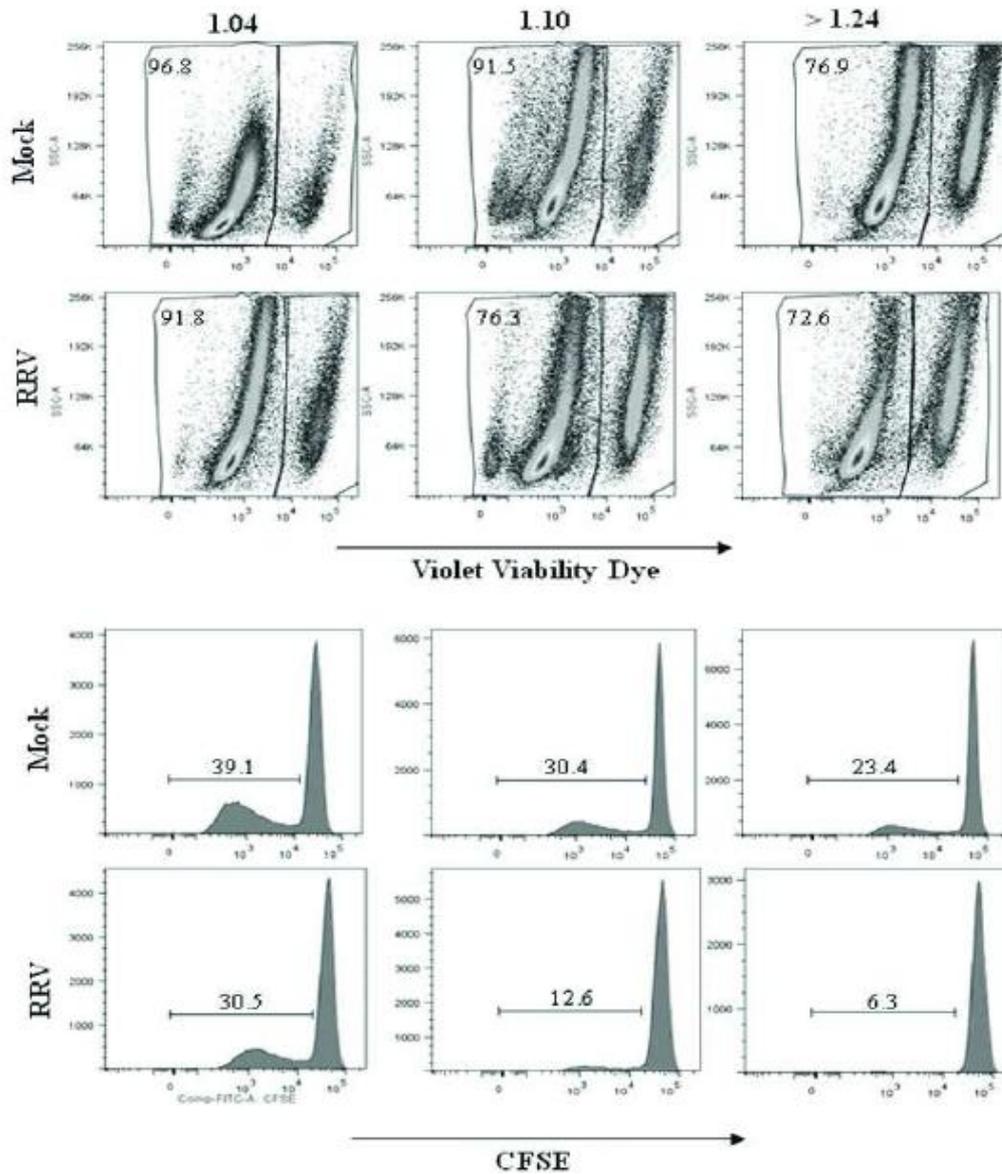


Figura 8.7.3. Exosomas de células infectadas con RV tienen una capacidad incrementada para inhibir la función de LT. Preparaciones F3 de células infectadas con RV o tratadas con mock durante 24 horas fueron ultracentrifugadas sobre un gradiente continuo de sacarosa (2.0-0.5M) a 100.000 xg por 15 horas. Se recuperaron fracciones de 1 ml y se agruparon las fracciones entre 1.10-1.18 g/ml y las mayores a 1.24 g/ml y luego se precipitaron por ultracentrifugación. Cantidades de cada fracción que contienen 1, 4 y 8 mU de AChE se evaluaron por su capacidad para inhibir la viabilidad/proliferación de LT CD4+ CFSE. Un volumen comparable (de acuerdo al volumen más alto ensayado) de la fracción 1.04 g/ml se usó como control negativo. Acá se muestran los resultados

obtenidos para las preparaciones con 4 mU de actividad AChE. Después de 5 días de proliferación, las células se tiñeron con la tinción violeta de viabilidad y anti-CD4-PerCp-Cy5.5 y cerca de 1×10^5 células se adquirieron y analizaron con un FACS Aria. En los paneles de arriba se señalan los porcentajes de células viables y en los de abajo las células en proliferación.

9. DISCUSION GENERAL

En este trabajo se evaluó la producción de algunos posibles inmunomoduladores producidos por las CEI durante su interacción con el RV, usado como modelo de patógeno intestinal. Encontramos que durante la infección por RV se favorece la detección de las PCT HSC70 y HSP70, así como la liberación de las citocinas IL-8, PGE₂ y TGF-β1 en el sobrenadante de cultivo. Como ha sido descrito por otros (Bausero et ál., 2005; Clayton et ál., 2007; Clayton et ál., 2005; Gastpar et ál., 2005), encontramos que algunas de estas proteínas se encuentran en parte asociadas a una fracción enriquecida en VM. Algunos de estos factores como el PGE₂ y el TGF-β1, sumado a los bajos niveles detectados de IL-8 nos hacen pensar que el microambiente generado por las CEI durante la infección por RV es anti-inflamatorio, favoreciendo quizás la baja respuesta inmune específica observada en los niños infectados. Sin embargo, acá quisimos abordar el aspecto de las actividades inmunosupresoras que presentan las VM al interactuar directamente con LT; función que depende en parte de la presencia de la citocina TGF-β1 en estas VM.

La liberación de PCT como la HSC70 y la HSP70 se ha presentado como un mecanismo de entrega de señales de peligro al sistema inmune durante el estrés (Barreto et ál., 2003; Broquet et ál., 2003; Hunter-Lavin et ál., 2004). En el modelo de CEI, Broquet et ál (2003) mostraron que la HSP70 puede ser liberada por células Caco-2 y que esta liberación es aumentada después de un choque térmico. En la infección viral se ha observado que el Parvovirus favorece la liberación de HSP70 durante la interacción con células tumorales humanas (Moehler et ál., 2003). La liberación de las PCT se puede dar de una forma activa, a través de una regulación mediada por estímulos como el choque térmico o la presencia de las citocinas IFN-γ e IL-10 (Barreto et ál., 2003; Broquet et ál., 2003) o de una forma pasiva, como una consecuencia de la muerte celular (Basu et ál., 2000). Acá mostramos que la detección de las dos PCT estudiadas se da de forma concomitante con la de la enzima LDH y la caída en la resistencia transepitelial durante la infección por RV; sugiriendo que estas proteínas podrían ser liberadas de una forma pasiva, como una consecuencia del daño ocasionado por el virus (Figuras 8.1.1, 8.1.2, 8.1.3, 8.2.2 y 8.2.3). Se ha propuesto que la liberación de las PCT se puede dar como una consecuencia de la muerte celular por necrosis, y con consecuencias asociadas con la

capacidad inmunoestimulante de este tipo de muerte (Basu et ál., 2000; Kepp et ál., 2009; Saito, Dai, y Ohtsuka, 2005). Sin embargo, la asociación de estas proteínas con la fracción VM hace pensar también en un mecanismo de liberación activa. El papel funcional que podrían estar ejerciendo estas proteínas queda por estudiarse. Se ha sugerido que estas PCT pueden actuar a través de receptores celulares generando señales que favorecen la maduración de células dendríticas o la activación de macrófagos (Asea et ál., 2000; Basu et ál., 2000). Sin embargo, estos trabajos han sido bien controversiales debido a la alta posibilidad de contaminación con LPS (Gao y Tsan, 2003; Tsan y Gao, 2009). Por otro lado, se ha planteado la posibilidad de que estas proteínas puedan favorecer la transferencia antigénica a través de su actividad de tipo chaperona. Esta función tampoco ha podido ser establecida con claridad debido a la dificultad existente de eluir y caracterizar de forma exitosa los antígenos asociados a ellas (Javid, MacAry, y Lehner, 2007). Nosotros, a través de varios ensayos de co-inmunoprecipitación, no logramos mostrar una asociación entre las proteínas HSC70 y HSP70 liberadas y la proteína viral más abundante en el RV, VP6 (*datos no mostrados*). Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que péptidos particulares del RV puedan estar asociados a estas PCT liberadas. De tal forma que el estudio de las proteínas de choque producidas durante la infección por RV de CEI podría permitir la identificación de péptidos inmunogénicos o inmunodominantes asociados a estas PCT.

En el segundo artículo se diseñó una estrategia para estudiar la liberación de VM del tipo exosoma durante la infección por RV de CEI y su probable asociación con PCT y con la citocina TGF- β 1; dichas asociaciones se han descrito en algunos modelos (Bausero et ál., 2005; Clayton et ál., 2007; Clayton et ál., 2005; Gastpar et ál., 2005). Diferentes trabajos han definido las características que se deben evaluar cuando se quieren estudiar este tipo de vesículas, como son: i) presencia de marcadores típicos como la tetraspanina CD63, lactadherina (MFG-E8), y actividad AChE, así como la ausencia de proteínas del RE como la calnexina y la proteína nuclear histona H2B (Bausero et ál., 2005; Savina et ál., 2003; Thery et ál., 2001; Thery et ál., 1999; Veron et ál., 2005), ii) morfología típica en forma de copa y con un tamaño entre 50-100 nm (Thery et ál., 2006; van Niel et ál., 2001), iii) flotación de marcadores típicos de exosomas sobre un gradiente de sacarosa con una densidad típica entre 1.10 y 1.18 g/mL (Raposo et ál., 1996; Thery et ál., 2001). De acuerdo a la caracterización que realizamos, teniendo en cuenta cada uno de estos

parámetros, encontramos que en las preparaciones de VM (F3) realizadas a partir de los sobrenadantes de las células Caco-2 infectadas con RV o tratadas con mock se encuentran vesículas con características de exosomas (Figuras 8.3.1, 8.3.2, 8.3.3 y 8.3.4). Por lo tanto, la presencia de las PCT estudiadas y del TGF- β 1 en estas fracciones nos llevan a proponer que dichas moléculas se encuentran asociadas a estas VM, como ya ha sido descrito (Bausero et ál., 2005; Clayton et ál., 2007; Clayton et ál., 2005; Gastpar et ál., 2005; Thery et ál., 1999).

La presencia de CD63, un marcador endosomal tardío, en las preparaciones VM se ha usado como un indicativo de que estas vesículas no provienen de fragmentos de membrana plasmática desprendidos de las células (Thery, Ostrowski, y Segura, 2009). Además, un hecho sobresaliente en nuestros resultados es que la detección de marcadores de las VM (CD63 y la actividad AChE) se detectó desde las 6 horas pos infección (Figura 8.3.4). Tiempo en el cual la viabilidad celular y la integridad de la monocapa no habían sido afectadas por la infección con el virus (Figuras 8.1.2 y 8.1.3). Es claro que en dicho tiempo estos marcadores se detectaron en una mayor cantidad en las células infectadas por RV que en las células control mock. Una de las posibilidades que podría explicar este resultado, es que la infección por RV de CEI incrementa la liberación activa de VM del tipo exosomas, la cual va a ser posteriormente incrementada de una forma pasiva a medida que la viabilidad celular es comprometida. Sin embargo, es posible que la mayor detección de marcadores en las células infectadas se pueda deber a otros factores distintos como el tamaño o diferencias en la densidad de estos marcadores en las VM. Somos conscientes que de acuerdo a la forma de preparación y concentración de las VM hay una alta probabilidad de obtener una mezcla heterogénea de VM. Así que teniendo en cuenta la naturaleza de las células usadas en el modelo (células epiteliales diferenciadas y polarizadas durante el cultivo) y la necesidad de eliminar el uso del suero fetal bovino durante la infección, creemos que los cuerpos apoptóticos podrían dar cuenta de la mayor heterogeneidad. A diferencia de los exosomas, los cuerpos apoptóticos han sido pobremente caracterizados, sin embargo, algunos estudios nos revelan que estas vesículas podrían tener algunas características diferenciales respecto a los exosomas, como son la presencia de las diferentes tipos de histonas (Schiller et ál., 2008; Thery et ál., 2001) y una flotación en gradientes lineales de sacarosa concentrada principalmente hacia las densidades altas > a 1.24 g/mL (Thery et ál., 2001; Thery, Ostrowski, y Segura, 2009). Al

analizar estas características en nuestras preparaciones, aunque no encontramos la presencia de la histona H2B (Figura 8.3.2), si pudimos identificar marcadores como CD63, actividad AChE y HSC70 en las densidades mayores tanto en las VM de las células no infectadas como de las células infectadas por RV (Figura 8.7.2). Es probable que la no detección de la histona H2B se deba en parte al proceso de preparación de las VM, en el cual se hace inicialmente una filtración por una membrana de 0.22 μm , eliminando de esta forma los cuerpos apoptóticos más grandes. Se ha descrito que bajo algunos estímulos inflamatorios la proteína nuclear HMGB1 “High-mobility group box 1” puede ser secretada en exosomas a partir de células Caco-2 (Liu et ál., 2006). Sin embargo, en otros trabajos, la proteína HMGB1 se ha descrito como una señal de peligro pro-inflamatoria que se libera al sobrenadante a partir de células que están sufriendo un proceso de necrosis, mientras que en las células apoptóticas permanece estrechamente asociado al nucleosoma; por lo que algunos proponen la liberación de esta proteína como un marcador de muerte por necrosis o asociado a mecanismos de muerte inmunogénica (Scaffidi, Misteli, y Bianchi, 2002; Tesniere et ál., 2008). Acá no logramos detectar la proteína HMGB1 en las fracciones de VM de las células Caco-2 infectadas o no con RV (datos no mostrados). En resumen y teniendo cuenta la heterogeneidad de las VM encontradas, se puede entonces pensar que los exosomas son liberados activamente en las primeras horas de infección y posteriormente de una forma pasiva a medida que se produce la muerte celular, se liberarían VM como los cuerpos apoptóticos. Es importante entonces profundizar en las consecuencias para la respuesta inmune de esta cinética de liberación, pues se puede especular que las VM podrían llevar señales distintas a diferentes tiempos de la infección.

Dentro de la caracterización de estas VM, fue importante evaluar la asociación de antígeno de RV con estas preparaciones. Para poder analizar este aspecto se seleccionó a la proteína CD63 como blanco en ensayos de inmunoprecipitación, la cual se encuentra abundantemente asociada a las membranas de estas vesículas. Para lograr inmunoprecipitar las VM intactas, el procedimiento se realizó en ausencia de detergentes, sustancias reductoras u otros agentes que pudieran perturbar la integridad de las VM (Clayton et ál., 2005). De esta forma se logró co-inmunoprecipitar una muy pequeña proporción de la proteína viral VP6 junto con las VM CD63+ (Figura 8.4.1). Aunque los ensayos de co-inmunoprecipitación fueron controlados con el uso de controles de isotipo

irrelevantes, se descartó la posibilidad que el AcMo contra CD63 tuviera algún tipo de reactividad cruzada con las proteínas virales (Figuras 8.4.2 y 8.4.3). Por lo tanto consideramos que la asociación observada es específica. Además, esta asociación entre el antígeno de RV y las VM al parecer se establece desde la conformación intracelular de los cuerpos multivesiculares responsables de la generación de las vesículas de tipo exosoma, de acuerdo a los análisis por microscopia confocal (Figura 8.4.4). La relevancia funcional de estos hallazgos queda pendiente por estudiar. En ese sentido, se ha propuesto que algunas VM, como los exosomas, pueden favorecer mecanismos de transferencia antigénica a través de células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas, para mediar una respuesta inmune antígeno específica (Andre et ál., 2002). Por lo tanto, se podría postular que la infección por RV de las CEI a través de la generación de estas VM asociadas a antígeno viral tendría la potencialidad de mediar tales efectos. Se ha postulado que las CEI podrían servir como APC, ya que en un ambiente inflamatorio pueden expresar moléculas CMH-II (Hershberg y Mayer, 2000); sin embargo, la membrana basal dificulta la interacción de estas células con los LT. Por otro lado, se ha descrito recientemente que la infección por RV en cerdos libres de gérmenes incrementa la expresión de ARNm para IFN- γ en la mucosa intestinal del yeyuno (Hulst et ál., 2008). Por lo tanto este IFN- γ podría regular tanto la expresión de moléculas HLA-DR en las IEC (Lopes et ál., 1999), como la producción de exosomas que expresan estas moléculas CMH-II (van Niel et ál., 2001), tal como se ha descrito. Es importante anotar que la presencia de las moléculas CMH-II podría llegar a ser determinante en el éxito de la transferencia antigénica (Thery et ál., 2002), de tal forma que estos exosomas podrían ser eficientemente capturados por DC para finalmente mediar respuestas específicas de LT (Vincent-Schneider et ál., 2002). De esta forma, durante la infección por RV las VM que son liberadas por la membrana apical de los enterocitos podrían potencialmente mediar la transferencia antigénica al ser capturados por aquellas poblaciones de DC que pueden atravesar la barrera epitelial y muestrear el microambiente luminal a través de sus dendritas proyectadas (Rescigno et ál., 2001). Mientras que las VM producidas basolateralmente mediarían la transferencia antigénica a través de las DC de la lamina propia (activación secundaria de LT), de las placas de Peyer (activación primaria de LT) o inclusive, a través de mecanismos aún desconocidos, de los nódulos mesentéricos (Cook et ál., 2000; Fenaux et ál., 2006; Narvaez, Angel, y Franco, 2005; Van Niel et ál., 2003).

Algunos modelos han planteado que las VM interfieren con la función de LT cuando interactúan directamente sobre ellos, induciendo pérdida de la viabilidad (Huber et ál., 2005) o inhibiendo la respuesta proliferativa (Clayton et ál., 2007) en LT activados. Por lo tanto, quisimos evaluar de forma simultánea estas posibilidades exponiendo LT purificados y estimulados policlonalmente a las fracciones que contienen VM tanto de células infectadas como no infectadas y evaluando tanto su viabilidad como la proliferación. En estos ensayos se observó que las fracciones que contienen VM de las células Caco-2 infectadas y no infectadas con RV afectan tanto la viabilidad como la respuesta proliferativa de los LT (Figura 8.6.1). Estos efectos serían en parte mediados por el TGF- β ya que fueron revertidos cuando los LT se pre-trataron con el inhibidor del receptor del TGF- β ALK5i (Figura 8.6.3). Otros factores podrían ser responsables de mediar estas funciones asociadas a las VM; una molécula candidata es el Fas-L, la cual se ha visto asociada a VM producidas a partir de células de cáncer colo-rectal (Huber et ál., 2005). Cuando se analizó la funcionalidad de las fracciones que contienen las VM de diferente densidad, se encontró que en general las fracciones que contenían VM con flotación típica de cuerpos apoptóticos tienen un mayor efecto sobre la función (viabilidad y proliferación) de LT que la fracción con flotación típica de exosomas (Figura 8.7.3). De igual forma, las fracciones del gradiente que contienen los dos tipos de VM de las células infectadas tienen un mayor efecto sobre viabilidad y proliferación, que las de las células no infectadas. Las VM que tendrían mayor potencial para interactuar de forma directa con los LT son aquellas liberadas por la membrana basolateral, las cuales podrían principalmente afectar la funcionalidad de los LT efectores activados presentes en la lámina propia, pero también podrían llegar a sitios de activación tan distantes como los nódulos mesentéricos (Van Niel et ál., 2003).

Se ha propuesto que la acción combinada de exosomas con IL-2 aumenta fuertemente las funciones inhibitorias de LT reg; inclusive, los exosomas por sí solos favorecen un incremento en el porcentaje de LT CD4+Foxp3+ (Clayton et ál., 2007). Cada vez se vuelve más claro que los LTreg son uno de los principales mecanismos supresores que actúan en el intestino, donde se ha mostrado que la conversión en periferia de células no reguladoras a reguladoras ocurre en la lámina propia y los tejidos linfoides asociados a intestino (Sun et ál., 2007). En el modelo de RV se ha observado que la infección en

ratones neonatos induce una expansión de una población de LTreg, y que al eliminar estas células antes de la infección, se modifica la respuesta celular específica de RV. Este efecto se vio reflejado en el aumento de las respuestas proliferativas y de secreción de IFN- γ en LT CD4+ y CD8+, sin embargo, esta remoción de LTreg no tuvo ningún efecto sobre la replicación y la liberación del virus o la severidad de la enfermedad (Kim et ál., 2008). Por lo tanto, es posible que en nuestro modelo la respuesta inhibitoria de la función de LT pueda estar asociada con la estimulación de la actividad de LT reg, que en parte podrían ser responsables de los muy bajos niveles de LT CD4+ específicos RV observados en los niños infectados.

Un aspecto crítico a tener en cuenta en el modelo presentado acá es el origen tumoral de las células Caco-2; esto a pesar de que cuando estas células se diferencian *in vitro* tienen algunas características propias de las CEI (Casola et ál., 1998; Simon-Assmann et ál., 2007; Van Beers et ál., 1995) y que han sido extensivamente usadas como modelo de infección por RV (Lopez y Arias, 2006). Por otro lado, hay que sumarle el hecho que la actividad funcional sobre los LT ha sido descrita como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune antitumoral (Clayton et ál., 2007; Huber et ál., 2005). Sin embargo, hay varios aspectos que apoyan el hecho que estas VM con las funciones que proponemos acá puedan ser producidas en un tejido normal: i) En los artículos donde se ha trabajado en el modelo de exosomas de origen tumoral nunca se ha evaluado la contrapartida normal de las células tumorales, para descartar que no es una función mantenida por las células durante la transformación celular. Hay que tener en cuenta que la eficiencia en producción de estas vesículas es supremamente baja, por lo que el uso de cultivos primarios es muy poco útil. ii) Se ha planteado que exosomas producto de la actividad de tejidos normales pueden regular la respuesta inmune en sitios asociados con el desarrollo de tolerancia como el ojo, el timo y el intestino (McKechnie et ál., 2006; Ostman, Taube, y Telemo, 2005; Wang et ál., 2008); hay que destacar el hecho que algunos de estos trabajos son a partir de exosomas obtenidos *in vivo*. iii) El haber logrado detectar en heces de niños con GE la proteína CD63 y haber podido co-inmunoprecipitar antígeno de VP6 con estas fracciones de vesículas CD63+ en niños infectados con RV nos lleva a pensar que estos mecanismos *in vitro* pueden ocurrir *in vivo*. Sin embargo, somos concientes que se requiere un mayor trabajo en ese sentido.

Finalmente, hay que resaltar el hecho que las funciones de las fracciones que contienen VM sobre los LT se presentan tanto en las que provienen de las células no infectadas como las infectadas por RV; sin embargo, en términos generales el efecto es mayor para aquellas fracciones de las células infectadas tanto las VM con flotación típica de exosomas como las VM más densas (Figuras 8.6.1, 8.6.2 y 8.7.3). Por lo tanto, en este trabajo proponemos un mecanismo novedoso a través del cual un virus, el RV, puede aprovecharse de los ambientes tolerogénicos (presencia de TGF- β 1, PGE2, bajos niveles de IL-8) donde se replican para favorecer la producción de VM con propiedades inmunosupresoras sobre los LT. De esta forma, durante la infección por RV se podría incrementar la liberación de estas VM inmunoregulatorias a través de la membrana basolateral de las CEI, que al interactuar posteriormente con los LT activados presentes en la lamina propia de los sitios efectores, regularían negativamente la respuesta inmune frente al RV. Hacia el futuro se espera poder caracterizar diferencialmente los diferentes tipos de VM producidas, así como poder identificar otras posibles moléculas responsables de los efectos sobre la función de LT. De igual forma sería muy interesante establecer el papel que puedan estar mediando los LTreg en el modelo acá presentado, así como la funcionalidad *in vivo* de todos estos factores.

10. ARTICULOS

10.1. ARTICULO NO. 1:

El artículo No 1 titulado “Immunomodulators released during rotavirus infection of polarized caco-2 cells” fue publicado en la revista *Viral Immunology* en: 22(3): 163-172, 2009.

10.1.1. Introducción

La infección por RV se caracteriza por producir una respuesta inmune que no es del todo protectora, permitiendo re-infecciones en encuentros posteriores con el virus. Se ha postulado que el microambiente del intestino donde se replica el RV genera diferentes clases de moléculas y estructuras con potencial de regular la respuesta inmune.

10.1.2. Materiales y Métodos

Para analizar la interacción del RV con los enterocitos intestinales, se tomó como modelo de CEI a la línea celular Caco-2. Estas células se diferencian espontáneamente durante su cultivo *in vitro* en sistemas Transwell. En este modelo se estudió el efecto de la infección por RV en la producción de algunas citocinas, PGE2 y de las PCT HSC70 y HSP70. La viabilidad de las células polarizadas se evaluó mediante la detección de LDH en el sobrenadante e cultivo.

10.1.3. Resultados y conclusiones

Se encontró que durante la infección de las células Caco-2 diferenciadas se produce la liberación de PGE2 y de pequeñas cantidades de IL-8 y TGF- β 1, pero no IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, o TNF- α . El TGF- β 1 se liberó de forma preferencial hacia el compartimento basal. Este conjunto de mediadores son considerados como anti-inflamatorios, es decir, que no favorecen el desarrollo de una respuesta Th1 potente. También se evidenció la presencia de las proteínas HSC70 y HSP70 en el sobrenadante de cultivo apical. La presencia concomitante de estas PCT junto con la LDH hace pensar que la liberación de estas señales de peligro se da de una forma pasiva, como consecuencia de la muerte celular durante la infección. Pero también se ha descrito que las PCT pueden ser liberadas de una forma asociada a vesículas de membrana exocitadas por las células y conocidas como exosomas, las cuales pueden tener funciones inmunes complejas y por lo tanto esta posibilidad se evaluó en el artículo No. 2.

10.2. ARTICULO NO. 2:

El artículo No 2 titulado “Membrane vesicles released by intestinal epithelial cells infected with rotavirus inhibit T cell function” será sometido a publicación a la revista *Viral Immunology*.

10.2.1. Introducción

Se ha descrito que los niños y adultos infectados con RV presentan una frecuencia relativamente baja de LT CD4+ y CD8+ específicos contra el virus (Jaimes et al., 2002; Rojas et al., 2003) y se ha postulado que esto puede ser una de las causas de la baja protección observada durante la primoinfección. Hemos postulado que durante la interacción entre el RV como patógeno intestinal y su blanco natural, el enterocito, se producen algunos inmunomoduladores responsables de regular este tipo de respuestas. Usando como modelo de CEI la línea celular Caco-2, en el primer artículo se mostró que entre una serie de distintos inmunomoduladores se producen las PCTs HSC70 y HSP70 y la citocina TGF- β . Se ha descrito que estas moléculas se pueden encontrar a algunas vesículas de membrana conocidas como exosomas, las cuales pueden desempeñar distintas funciones inmunomoduladoras.

10.2.2. Materiales y Métodos

Para analizar si las PCT HSC70 y HSP70, así como la citocina TGF- β se encuentran asociadas a VM se hicieron preparaciones de VM a partir del sobrenadante de células Caco-2 infectadas con RV o tratadas con el control mock. Se caracterizaron estas preparaciones a partir de marcadores descritos para exosomas, imágenes de microscopía electrónica y flotación sobre un gradiente lineal de sacarosa. Para evaluar la posible asociación de antígeno de RV a estas VM, las vesículas se inmunoprecipitaron a través del marcador CD63 y se analizó la co-inmunoprecipitación con el antígeno de RV VP6. Por otro lado, se estudió el efecto inmunomodulador de estas VM sobre linfocitos T CD4+ estimulados policlonalmente.

10.2.3. Resultados y conclusiones

Se encontró que las PCT y el TGF- β derivados de CEI infectadas o no con RV se encuentran asociados a una fracción que contiene VM. En este artículo presentamos

evidencias de una asociación de estas VM con el antígeno de RV VP6, lo que nos hace pensar que durante la infección por RV estas VM que provienen de las CEI tendrían la capacidad de mediar mecanismos de transferencia antigénica, tal como ha sido propuesto por algunos patógenos. Esta misma asociación se encontró a partir de VM recuperadas de materia fecal de niños infectados por RV, lo que nos muestra que estos hallazgos *in vitro* podrían tener alguna significancia *in vivo*. Por otro lado, se encontró que estas fracciones tienen un efecto inmunomodulador sobre LT purificados y activados; reflejado principalmente en la pérdida de la viabilidad, y de alguna forma en la inhibición de la proliferación de los LT. Al parecer estos efectos dependen del TGF- β 1 asociados con estas preparaciones de VM. Al analizar la fracción de VM se encontró una heterogeneidad representada en algunas con características típicas de exosomas, y otras que por sus características proponemos se tratan de cuerpos apoptóticos. Los exosomas provenientes de las células infectadas por RV presentaron una mayor capacidad para interferir con la función de los LT comparada con las de las CEI no infectadas. Por lo tanto, acá postulamos que este podría ser un mecanismo inmunomodulador mediado por el RV durante su infección a CEI el cual explicaría en parte la baja respuesta de LT observada durante la infección por RV.

11. ANEXOS

Resultados parciales de este trabajo se han presentado en los eventos de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología, Cell Stress Society International, así como de la comunidad internacional que trabaja en virus ARN de doble cadena:

1. Barreto, A., Rodriguez, LS., Angel, J, Franco, MA. **Liberación de proteínas de choque térmico durante la infección por rotavirus de células epiteliales de origen intestinal.** VI Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia Asma e Inmunología, Medellín- Colombia, Mayo 2007.
2. Barreto, A., Rodriguez, LS., Angel, J, Franco, MA. **Heat Shock Proteins are released by an intestinal epithelial cell line infected with rotavirus.** 2nd World Conference of Stress, Budapest-Hungría, Agosto 2007.
3. Barreto, A., Rojas, OL., Rodriguez, LS., Franco, MA., Angel, J. **Análisis de la actividad funcional de microvesículas liberadas por células epiteliales intestinales durante su infección por rotavirus.** VII Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia Asma e Inmunología, Cartagena- Colombia, Mayo 2009.
4. Barreto, A., Rodriguez, LS., Rojas, OL., Wolf, M., Greenberg, H., Franco, MA., Angel, J. **Microvesicles released by intestinal epithelial cells infected with rotavirus inhibit T cell function.** Tenth International Symposium on Double-Stranded RNA viruses, Hamilton Island-Australia, Junio 2009.
5. Rodriguez, LS., Barreto, A., Franco, MA., Angel, J. **Immunomodulators released during rotavirus infection of polarized Caco-2 cells.** Tenth International Symposium on Double-Stranded RNA viruses, Hamilton Island-Australia, Junio 2009.

12. BIBLIOGRAFIA GENERAL

- Agace, W. W. (2008). T-cell recruitment to the intestinal mucosa. *Trends Immunol* **29**(11), 514-22.
- Agnew, L. L., Kelly, M., Howard, J., Jeganathan, S., Batterham, M., French, R. A., Gold, J., and Watson, K. (2003). Altered lymphocyte heat shock protein 70 expression in patients with HIV disease. *Aids* **17**(13), 1985-8.
- Almqvist, N., Lonnqvist, A., Hultkrantz, S., Rask, C., and Telemo, E. (2008). Serum-derived exosomes from antigen-fed mice prevent allergic sensitization in a model of allergic asthma. *Immunology* **125**(1), 21-7.
- Andre, F., Scharz, N. E., Movassagh, M., Flament, C., Pautier, P., Morice, P., Pomel, C., Lhomme, C., Escudier, B., Le Chevalier, T., Tursz, T., Amigorena, S., Raposo, G., Angevin, E., and Zitvogel, L. (2002). Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* **360**(9329), 295-305.
- Angel, J., Franco, M. A., and Greenberg, H. B. (2007). Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol* **5**(7), 529-39.
- Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* **8**(6), 411-20.
- Asea, A. (2003). Chaperokine-induced signal transduction pathways. *Exerc Immunol Rev* **9**, 25-33.
- Asea, A., Kraeft, S. K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., Koo, G. C., and Calderwood, S. K. (2000). HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* **6**(4), 435-42.
- Ball, J. M., Tian, P., Zeng, C. Q., Morris, A. P., and Estes, M. K. (1996). Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* **272**(5258), 101-4.
- Barreto, A., Gonzalez, J. M., Kabingu, E., Asea, A., and Fiorentino, S. (2003). Stress-induced release of HSC70 from human tumors. *Cell Immunol* **222**(2), 97-104.
- Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M., and Srivastava, P. K. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* **12**(11), 1539-46.
- Bausero, M. A., Gastpar, R., Multhoff, G., and Asea, A. (2005). Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72. *J Immunol* **175**(5), 2900-12.
- Beau, I., Cotte-Laffitte, J., Geniteau-Legendre, M., Estes, M. K., and Servin, A. L. (2007). An NSP4-dependant mechanism by which rotavirus impairs lactase enzymatic activity in brush border of human enterocyte-like Caco-2 cells. *Cell Microbiol* **9**(9), 2254-66.
- Bens, M., Bogdanova, A., Cluzeaud, F., Miquerol, L., Kerneis, S., Kraehenbuhl, J. P., Kahn, A., Pringault, E., and Vandewalle, A. (1996). Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype. *Am J Physiol* **270**(6 Pt 1), C1666-74.
- Benson, M. J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M., and Noelle, R. J. (2007). All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* **204**(8), 1765-74.

- Blachere, N. E., Li, Z., Chandawarkar, R. Y., Suto, R., Jaikaria, N. S., Basu, S., Udono, H., and Srivastava, P. K. (1997). Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med* **186**(8), 1315-22.
- Boshuizen, J. A., Reimerink, J. H., Korteland-van Male, A. M., van Ham, V. J., Koopmans, M. P., Buller, H. A., Dekker, J., and Einerhand, A. W. (2003). Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. *J Virol* **77**(24), 13005-16.
- Broquet, A. H., Lenoir, C., Gardet, A., Sapin, C., Chwetzoff, S., Jouniaux, A. M., Lopez, S., Trugnan, G., Bachelet, M., and Thomas, G. (2007). Hsp70 negatively controls rotavirus protein bioavailability in caco-2 cells infected by the rotavirus RF strain. *J Virol* **81**(3), 1297-304.
- Broquet, A. H., Thomas, G., Masliah, J., Trugnan, G., and Bachelet, M. (2003). Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. *J Biol Chem* **278**(24), 21601-6.
- Buning, J., von Smolinski, D., Tafazzoli, K., Zimmer, K. P., Strobel, S., Apostolaki, M., Kollias, G., Heath, J. K., Ludwig, D., and Gebert, A. (2008). Multivesicular bodies in intestinal epithelial cells: responsible for MHC class II-restricted antigen processing and origin of exosomes. *Immunology* **125**(4), 510-21.
- Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L., and Briskin, M. (1999). Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* **72**, 209-53.
- Casola, A., Estes, M. K., Crawford, S. E., Ogra, P. L., Ernst, P. B., Garofalo, R. P., and Crowe, S. E. (1998). Rotavirus infection of cultured intestinal epithelial cells induces secretion of CXC and CC chemokines. *Gastroenterology* **114**(5), 947-55.
- Clark, H. F., Bernstein, D. I., Dennehy, P. H., Offit, P., Pichichero, M., Treanor, J., Ward, R. L., Krah, D. L., Shaw, A., Dallas, M. J., Laura, D., Eiden, J. J., Ivanoff, N., Kaplan, K. M., and Heaton, P. (2004). Safety, efficacy, and immunogenicity of a live, quadrivalent human-bovine reassortant rotavirus vaccine in healthy infants. *J Pediatr* **144**(2), 184-90.
- Clayton, A., Mitchell, J. P., Court, J., Mason, M. D., and Tabi, Z. (2007). Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res* **67**(15), 7458-66.
- Clayton, A., Turkes, A., Navabi, H., Mason, M. D., and Tabi, Z. (2005). Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci* **118**(Pt 16), 3631-8.
- Cocucci, E., Racchetti, G., and Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* **19**(2), 43-51.
- Cook, D. N., Prosser, D. M., Forster, R., Zhang, J., Kuklin, N. A., Abbondanzo, S. J., Niu, X. D., Chen, S. C., Manfra, D. J., Wiekowski, M. T., Sullivan, L. M., Smith, S. R., Greenberg, H. B., Narula, S. K., Lipp, M., and Lira, S. A. (2000). CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* **12**(5), 495-503.
- Coulson, B. S., Grimwood, K., Hudson, I. L., Barnes, G. L., and Bishop, R. F. (1992). Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *J Clin Microbiol* **30**(7), 1678-84.
- Chaibi, C., Cotte-Laffitte, J., Sandre, C., Esclatine, A., Servin, A. L., Quero, A. M., and Geniteau-Legendre, M. (2005). Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. *Virology* **332**(2), 480-90.

- Chromy, L. R., Pipas, J. M., and Garcea, R. L. (2003). Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(18), 10477-82.
- Delmas, O., Gardet, A., Chwetzoff, S., Breton, M., Cohen, J., Colard, O., Sapin, C., and Trugnan, G. (2004). Different ways to reach the top of a cell. Analysis of rotavirus assembly and targeting in human intestinal cells reveals an original raft-dependent, Golgi-independent apical targeting pathway. *Virology* **327**(2), 157-61.
- Dennehy, P. H. (2008). Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev* **21**(1), 198-208.
- Dickman, K. G., Hempson, S. J., Anderson, J., Lippe, S., Zhao, L., Burakoff, R., and Shaw, R. D. (2000). Rotavirus alters paracellular permeability and energy metabolism in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**(4), G757-66.
- Fenaux, M., Cuadras, M. A., Feng, N., Jaimes, M., and Greenberg, H. B. (2006). Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice. *J Virol* **80**(11), 5219-32.
- Franco, M. A., Angel, J., and Greenberg, H. B. (2006). Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* **24**(15), 2718-31.
- Gao, B., and Tsan, M. F. (2003). Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J Biol Chem* **278**(1), 174-9.
- Gaspar-Smith, N., Crossman, D. M., Whitesides, J. F., Mensali, N., Ottinger, J. S., Plonk, S. G., Moody, M. A., Ferrari, G., Weinhold, K. J., Miller, S. E., Reich, C. F., 3rd, Qin, L., Self, S. G., Shaw, G. M., Denny, T. N., Jones, L. E., Pisetsky, D. S., and Haynes, B. F. (2008). Induction of plasma (TRAIL), TNFR-2, Fas ligand, and plasma microparticles after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission: implications for HIV-1 vaccine design. *J Virol* **82**(15), 7700-10.
- Gastpar, R., Gehrman, M., Bausero, M. A., Asea, A., Gross, C., Schroeder, J. A., and Multhoff, G. (2005). Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* **65**(12), 5238-47.
- Gething, M. J., and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* **355**(6355), 33-45.
- Greenberg, H. B., and Estes, M. K. (2009). Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology* **136**(6), 1939-51.
- Guerrero, C. A., Bouyssouade, D., Zarate, S., Isa, P., Lopez, T., Espinosa, R., Romero, P., Mendez, E., Lopez, S., and Arias, C. F. (2002). Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J Virol* **76**(8), 4096-102.
- Hemler, M. E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 397-422.
- Hershberg, R. M., and Mayer, L. F. (2000). Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today* **21**(3), 123-8.
- Heyman, M., Crain-Denoyelle, A. M., Nath, S. K., and Desjeux, J. F. (1990). Quantification of protein transcytosis in the human colon carcinoma cell line CaCo-2. *J Cell Physiol* **143**(2), 391-5.

- Huber, V., Fais, S., Iero, M., Lugini, L., Canese, P., Squarcina, P., Zaccheddu, A., Colone, M., Arancia, G., Gentile, M., Seregni, E., Valenti, R., Ballabio, G., Belli, F., Leo, E., Parmiani, G., and Rivoltini, L. (2005). Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* **128**(7), 1796-804.
- Hulst, M., Kerstens, H., de Wit, A., Smits, M., van der Meulen, J., and Niewold, T. (2008). Early transcriptional response in the jejunum of germ-free piglets after oral infection with virulent rotavirus. *Arch Virol* **153**(7), 1311-22.
- Hunter-Lavin, C., Davies, E. L., Bacelar, M. M., Marshall, M. J., Andrew, S. M., and Williams, J. H. (2004). Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* **324**(2), 511-7.
- Isa, P., Realpe, M., Romero, P., Lopez, S., and Arias, C. F. (2004). Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* **322**(2), 370-81.
- Izcue, A., Coombes, J. L., and Powrie, F. (2009). Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol* **27**, 313-38.
- Izcue, A., and Powrie, F. (2008). Special regulatory T-cell review: Regulatory T cells and the intestinal tract--patrolling the frontier. *Immunology* **123**(1), 6-10.
- Jaimes, M. C., Rojas, O. L., Gonzalez, A. M., Cajiao, I., Charpilienne, A., Pothier, P., Kohli, E., Greenberg, H. B., Franco, M. A., and Angel, J. (2002). Frequencies of virus-specific CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes secreting gamma interferon after acute natural rotavirus infection in children and adults. *J Virol* **76**(10), 4741-9.
- Javid, B., MacAry, P. A., and Lehner, P. J. (2007). Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity. *J Immunol* **179**(4), 2035-40.
- Jayaram, H., Taraporewala, Z., Patton, J. T., and Prasad, B. V. (2002). Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold. *Nature* **417**(6886), 311-5.
- Jolly, C., and Morimoto, R. I. (2000). Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* **92**(19), 1564-72.
- Jourdan, N., Brunet, J. P., Sapin, C., Blais, A., Cotte-Laffitte, J., Forestier, F., Quero, A. M., Trugnan, G., and Servin, A. L. (1998). Rotavirus infection reduces sucrase-isomaltase expression in human intestinal epithelial cells by perturbing protein targeting and organization of microvillar cytoskeleton. *J Virol* **72**(9), 7228-36.
- Jourdan, N., Maurice, M., Delautier, D., Quero, A. M., Servin, A. L., and Trugnan, G. (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**(11), 8268-78.
- Kagnoff, M. F., and Eckmann, L. (1997). Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* **100**(1), 6-10.
- Kaljot, K. T., Shaw, R. D., Rubin, D. H., and Greenberg, H. B. (1988). Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol* **62**(4), 1136-44.
- Karlsson, M., Lundin, S., Dahlgren, U., Kahu, H., Pettersson, I., and Telemo, E. (2001). "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol* **31**(10), 2892-900.
- Kepp, O., Tesniere, A., Schlemmer, F., Michaud, M., Senovilla, L., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2009). Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Apoptosis* **14**(4), 364-75.

- Keryer-Bibens, C., Pioche-Durieu, C., Villemant, C., Souquere, S., Nishi, N., Hirashima, M., Middeldorp, J., and Busson, P. (2006). Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer* **6**, 283.
- Kim, B., Feng, N., Narvaez, C. F., He, X. S., Eo, S. K., Lim, C. W., and Greenberg, H. B. (2008). The influence of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells on the immune response to rotavirus infection. *Vaccine* **26**(44), 5601-11.
- Kordasti, S., Sjovall, H., Lundgren, O., and Svensson, L. (2004). Serotonin and vasoactive intestinal peptide antagonists attenuate rotavirus diarrhoea. *Gut* **53**(7), 952-7.
- Kumaraguru, U., Gierynska, M., Norman, S., Bruce, B. D., and Rouse, B. T. (2002). Immunization with chaperone-peptide complex induces low-avidity cytotoxic T lymphocytes providing transient protection against herpes simplex virus infection. *J Virol* **76**(1), 136-41.
- Kunisawa, J., Nochi, T., and Kiyono, H. (2008). Immunological commonalities and distinctions between airway and digestive immunity. *Trends Immunol* **29**(11), 505-13.
- Lancaster, G. I., and Febbraio, M. A. (2005). Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem* **280**(24), 23349-55.
- Leung, T. K., Hall, C., Rajendran, M., Spurr, N. K., and Lim, L. (1992). The human heat-shock genes HSPA6 and HSPA7 are both expressed and localize to chromosome 1. *Genomics* **12**(1), 74-9.
- Lev, A., Takeda, K., Zanker, D., Maynard, J. C., Dimberu, P., Waffarn, E., Gibbs, J., Netzer, N., Princiotta, M. F., Neckers, L., Picard, D., Nichitta, C. V., Chen, W., Reiter, Y., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W. (2008). The exception that reinforces the rule: crosspriming by cytosolic peptides that escape degradation. *Immunity* **28**(6), 787-98.
- Liu, S., Stolz, D. B., Sappington, P. L., Macias, C. A., Killeen, M. E., Tenhunen, J. J., Delude, R. L., and Fink, M. P. (2006). HMGB1 is secreted by immunostimulated enterocytes and contributes to cytomix-induced hyperpermeability of Caco-2 monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**(4), C990-9.
- Lopes, L. M., Hughson, E., Anstee, Q., O'Neil, D., Katz, D. R., and Chain, B. M. (1999). Vectorial function of major histocompatibility complex class II in a human intestinal cell line. *Immunology* **98**(1), 16-26.
- Lopez, S., and Arias, C. F. (2006). Early steps in rotavirus cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol* **309**, 39-66.
- Lundgren, O., Peregrin, A. T., Persson, K., Kordasti, S., Uhnö, I., and Svensson, L. (2000). Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science* **287**(5452), 491-5.
- MacKay, P. A., Leibundgut-Landmann, S., Koch, N., Dunn, A. C., Reith, W., Jack, R. W., and McLellan, A. D. (2006). Circulating, soluble forms of major histocompatibility complex antigens are not exosome-associated. *Eur J Immunol* **36**(11), 2875-84.
- Mallegol, J., Van Niel, G., Lebreton, C., Lepelletier, Y., Candalh, C., Dugave, C., Heath, J. K., Raposo, G., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2007). T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells. *Gastroenterology* **132**(5), 1866-76.

- Maruri-Avidal, L., Lopez, S., and Arias, C. F. (2008). Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles. *J Virol* **82**(11), 5368-80.
- Masciopinto, F., Giovani, C., Campagnoli, S., Galli-Stampino, L., Colombatto, P., Brunetto, M., Yen, T. S., Houghton, M., Pileri, P., and Abrignani, S. (2004). Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *Eur J Immunol* **34**(10), 2834-42.
- Matzinger, P. (2007). Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat Immunol* **8**(1), 11-3.
- McKechnie, N. M., King, B. C., Fletcher, E., and Braun, G. (2006). Fas-ligand is stored in secretory lysosomes of ocular barrier epithelia and released with microvesicles. *Exp Eye Res* **83**(2), 304-14.
- Milner, C. M., and Campbell, R. D. (1992). Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* **36**(6), 357-62.
- Moehler, M., Zeidler, M., Schede, J., Rommelaere, J., Galle, P. R., Cornelis, J. J., and Heike, M. (2003). Oncolytic parvovirus H1 induces release of heat-shock protein HSP72 in susceptible human tumor cells but may not affect primary immune cells. *Cancer Gene Ther* **10**(6), 477-80.
- Multhoff, G., Botzler, C., Jennen, L., Schmidt, J., Ellwart, J., and Issels, R. (1997). Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *J Immunol* **158**(9), 4341-50.
- Narvaez, C. F., Angel, J., and Franco, M. A. (2005). Interaction of rotavirus with human myeloid dendritic cells. *J Virol* **79**(23), 14526-35.
- Nguyen, D. G., Booth, A., Gould, S. J., and Hildreth, J. E. (2003). Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem* **278**(52), 52347-54.
- Ostman, S., Taube, M., and Telemo, E. (2005). Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent. *Immunology* **116**(4), 464-76.
- Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresse, J. S., and Glass, R. I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* **12**(2), 304-6.
- Patel, M., Pedreira, C., De Oliveira, L. H., Tate, J., Orozco, M., Mercado, J., Gonzalez, A., Malespin, O., Amador, J. J., Umana, J., Balmaseda, A., Perez, M. C., Gentsch, J., Kerin, T., Hull, J., Mijatovic, S., Andrus, J., and Parashar, U. (2009). Association between pentavalent rotavirus vaccine and severe rotavirus diarrhea among children in Nicaragua. *Jama* **301**(21), 2243-51.
- Perez-Vargas, J., Romero, P., Lopez, S., and Arias, C. F. (2006). The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity. *J Virol* **80**(7), 3322-31.
- Perfetto, S. P., Chattopadhyay, P. K., Lamoreaux, L., Nguyen, R., Ambrozak, D., Koup, R. A., and Roederer, M. (2006). Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *J Immunol Methods* **313**(1-2), 199-208.
- Quaroni, A., and Beaulieu, J. F. (1997). Cell dynamics and differentiation of conditionally immortalized human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **113**(4), 1198-213.
- Ramig, R. F. (2004). Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* **78**(19), 10213-20.

- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., and Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* **183**(3), 1161-72.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2**(4), 361-7.
- Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G. M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* **6**(5), 507-14.
- Rojas, O. L., Gonzalez, A. M., Gonzalez, R., Perez-Schael, I., Greenberg, H. B., Franco, M. A., and Angel, J. (2003). Human rotavirus specific T cells: quantification by ELISPOT and expression of homing receptors on CD4+ T cells. *Virology* **314**(2), 671-9.
- Rollo, E. E., Kumar, K. P., Reich, N. C., Cohen, J., Angel, J., Greenberg, H. B., Sheth, R., Anderson, J., Oh, B., Hempson, S. J., Mackow, E. R., and Shaw, R. D. (1999). The epithelial cell response to rotavirus infection. *J Immunol* **163**(8), 4442-52.
- Saito, K., Dai, Y., and Ohtsuka, K. (2005). Enhanced expression of heat shock proteins in gradually dying cells and their release from necrotically dead cells. *Exp Cell Res* **310**(1), 229-36.
- Sanchez-San Martin, C., Lopez, T., Arias, C. F., and Lopez, S. (2004). Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol* **78**(5), 2310-8.
- Savina, A., Furlan, M., Vidal, M., and Colombo, M. I. (2003). Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem* **278**(22), 20083-90.
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**(6894), 191-5.
- Schiller, M., Bekeredjian-Ding, I., Heyder, P., Blank, N., Ho, A. D., and Lorenz, H. M. (2008). Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death Differ* **15**(1), 183-91.
- Sedger, L., and Ruby, J. (1994). Heat shock response to vaccinia virus infection. *J Virol* **68**(7), 4685-9.
- Sheth, R., Anderson, J., Sato, T., Oh, B., Hempson, S. J., Rollo, E., Mackow, E. R., and Shaw, R. D. (1996). Rotavirus stimulates IL-8 secretion from cultured epithelial cells. *Virology* **221**(2), 251-9.
- Simon-Assmann, P., Turck, N., Sidhoum-Jenny, M., Gradwohl, G., and Kedinger, M. (2007). In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol* **23**(4), 241-56.
- Simons, M., and Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* **21**(4), 575-81.
- Somersan, S., Larsson, M., Fonteneau, J. F., Basu, S., Srivastava, P., and Bhardwaj, N. (2001). Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* **167**(9), 4844-52.
- Srivastava, P. K., DeLeo, A. B., and Old, L. J. (1986). Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(10), 3407-11.

- Srivastava, P. K., Udono, H., Blachere, N. E., and Li, Z. (1994). Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* **39**(2), 93-8.
- Strober, W. (2008). Vitamin A rewrites the ABCs of oral tolerance. *Mucosal Immunol* **1**(2), 92-5.
- Sun, C. M., Hall, J. A., Blank, R. B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J. R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* **204**(8), 1775-85.
- Tamura, Y., Tsuboi, N., Sato, N., and Kikuchi, K. (1993). 70 kDa heat shock cognate protein is a transformation-associated antigen and a possible target for the host's anti-tumor immunity. *J Immunol* **151**(10), 5516-24.
- Tavaria, M., Gabriele, T., Anderson, R. L., Mirault, M. E., Baker, E., Sutherland, G., and Kola, I. (1995). Localization of the gene encoding the human heat shock cognate protein, HSP73, to chromosome 11. *Genomics* **29**(1), 266-8.
- Tesniere, A., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Joza, N., Panaretakis, T., Kepp, O., Schlemmer, F., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2008). Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr Opin Immunol* **20**(5), 504-11.
- Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 3**, Unit 3 22.
- Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* **166**(12), 7309-18.
- Thery, C., Duban, L., Segura, E., Veron, P., Lantz, O., and Amigorena, S. (2002). Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* **3**(12), 1156-62.
- Thery, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**(8), 581-93.
- Thery, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1999). Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* **147**(3), 599-610.
- Trask, S. D., and Dormitzer, P. R. (2006). Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *J Virol* **80**(22), 11293-304.
- Tsan, M. F., and Gao, B. (2009). Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol* **85**(6), 905-10.
- Van Beers, E. H., Al, R. H., Rings, E. H., Einerhand, A. W., Dekker, J., and Buller, H. A. (1995). Lactase and sucrase-isomaltase gene expression during Caco-2 cell differentiation. *Biochem J* **308** (Pt 3), 769-75.
- Van Niel, G., Mallegol, J., Bevilacqua, C., Candalh, C., Brugiere, S., Tomaskovic-Crook, E., Heath, J. K., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2003). Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut* **52**(12), 1690-7.
- van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* **121**(2), 337-49.

- Vende, P., Piron, M., Castagne, N., and Poncet, D. (2000). Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* **74**(15), 7064-71.
- Veron, P., Segura, E., Sugano, G., Amigorena, S., and Thery, C. (2005). Accumulation of MFG-E8/lactadherin on exosomes from immature dendritic cells. *Blood Cells Mol Dis* **35**(2), 81-8.
- Vincent-Schneider, H., Stumptner-Cuvelette, P., Lankar, D., Pain, S., Raposo, G., Benaroch, P., and Bonnerot, C. (2002). Exosomes bearing HLA-DR1 molecules need dendritic cells to efficiently stimulate specific T cells. *Int Immunol* **14**(7), 713-22.
- Vroiling, A. B., Fokkens, W. J., and van Drunen, C. M. (2008). How epithelial cells detect danger: aiding the immune response. *Allergy* **63**(9), 1110-23.
- Wang, G. J., Liu, Y., Qin, A., Shah, S. V., Deng, Z. B., Xiang, X., Cheng, Z., Liu, C., Wang, J., Zhang, L., Grizzle, W. E., and Zhang, H. G. (2008). Thymus exosomes-like particles induce regulatory T cells. *J Immunol* **181**(8), 5242-8.
- Warger, T., Hilf, N., Rechtsteiner, G., Haselmayer, P., Carrick, D. M., Jonuleit, H., von Landenberg, P., Rammensee, H. G., Nicchitta, C. V., Radsak, M. P., and Schild, H. (2006). Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses. *J Biol Chem* **281**(32), 22545-53.
- Wheeler, D. S., Chase, M. A., Senft, A. P., Poynter, S. E., Wong, H. R., and Page, K. (2009). Extracellular Hsp72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4. *Respir Res* **10**, 31.
- Xiao, S., Jin, H., Korn, T., Liu, S. M., Oukka, M., Lim, B., and Kuchroo, V. K. (2008). Retinoic acid increases Foxp3⁺ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J Immunol* **181**(4), 2277-84.
- Zarate, S., Cuadras, M. A., Espinosa, R., Romero, P., Juarez, K. O., Camacho-Nuez, M., Arias, C. F., and Lopez, S. (2003). Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J Virol* **77**(13), 7254-60.
- Zheng, H., and Li, Z. (2004). Cutting edge: cross-presentation of cell-associated antigens to MHC class I molecule is regulated by a major transcription factor for heat shock proteins. *J Immunol* **173**(10), 5929-33.
- Zijlstra, R. T., McCracken, B. A., Odle, J., Donovan, S. M., Gelberg, H. B., Petschow, B. W., Zuckermann, F. A., and Gaskins, H. R. (1999). Malnutrition modifies pig small intestinal inflammatory responses to rotavirus. *J Nutr* **129**(4), 838-43.