

03088 2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

EVALUACION DEL PAPEL DEL CALCIO, EN LAS PRIMERAS
INTERACCIONES DE ROTAVIRUS CON SU CELULA
HUESPED.

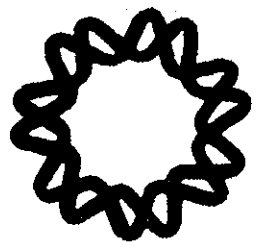
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

ROSA VICTORIA PANDO ROBLES



CUERNAVACA, MORELOS

ENERO, 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

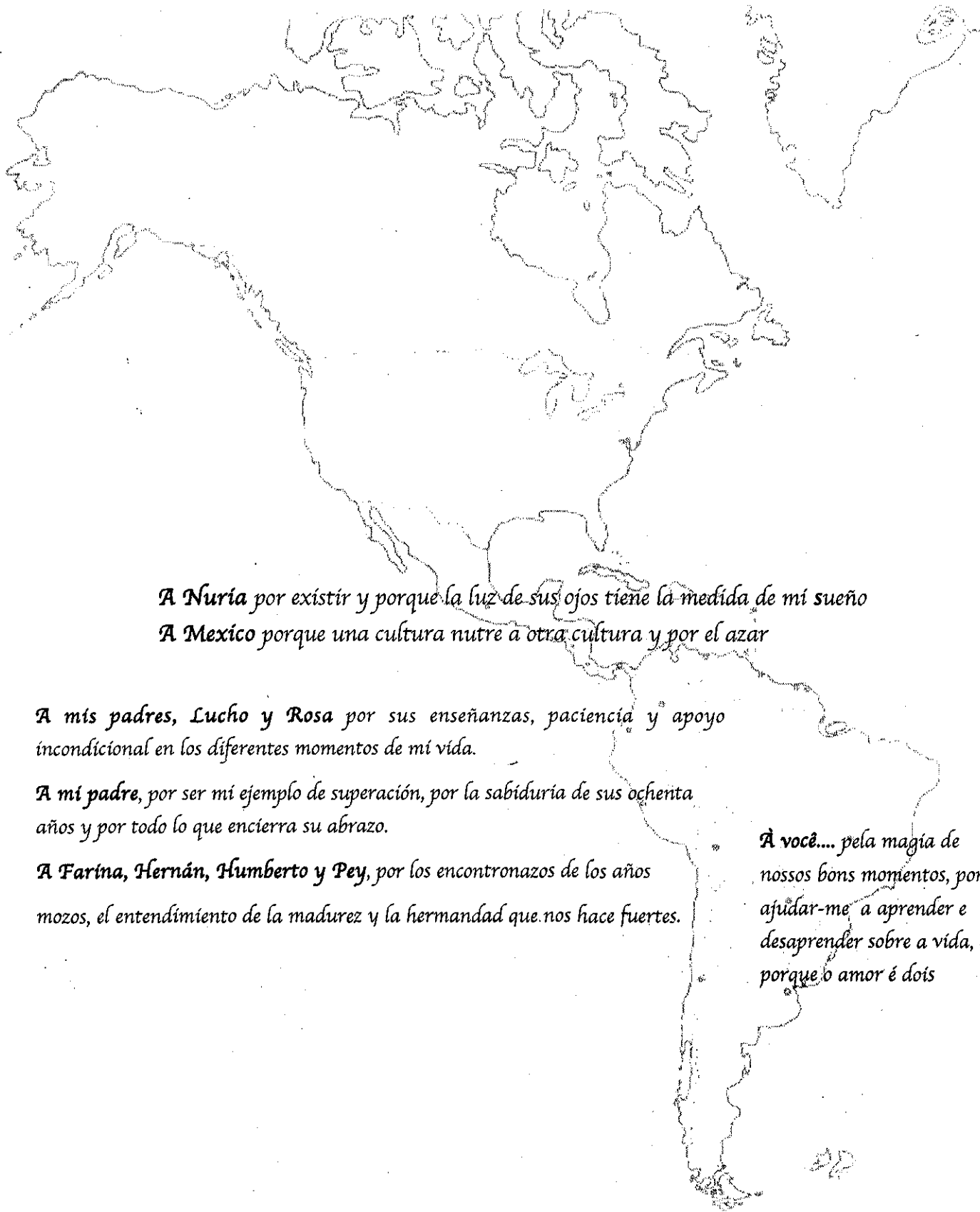
El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Susana López Charretón. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de una beca complemento de la Dirección General de Asuntos de Posgrado (DGEP-UNAM) (En.98-En.01), del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) a través del Proyecto 103341, y de una beca CUAUHTEMOC II/SRE/CONACYT/OEA (Ag.97-Jul.00) a través del Programa de Intercambio Académico de la Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México.

Uno es el hombre que anda por la tierra
y descubre la luz y dice es buena,
la realiza en los ojos y la entrega
a la rama del árbol, al río, a la ciudad,
al sueño, a la esperanza y a la espera.

Uno es el destino que penetra
la piel de Dios a veces,
y se confunde en todo y se dispersa.

Uno es el agua de la sed que tiene,
el silencio que calla nuestra lengua,
el pan, la sal y la amorosa urgencia
de aire movido en cada célula.

Uno es el hombre - lo han llamado hombre -
Que lo ve todo abierto, y calla y entra....
Jaime Sabines (Mexico)



*A Nuria por existir y porque la luz de sus ojos tiene la medida de mi sueño
A México porque una cultura nutre a otra cultura y por el azar*

A mis padres, Lucho y Rosa por sus enseñanzas, paciencia y apoyo incondicional en los diferentes momentos de mi vida.

A mi padre, por ser mi ejemplo de superación, por la sabiduría de sus ochenta años y por todo lo que encierra su abrazo.

A Farina, Hernán, Humberto y Pey, por los encontronazos de los años mozos, el entendimiento de la madurez y la hermandad que nos hace fuertes.

*A você.... pela magia de
nossos bons momentos, por
ajudar-me a aprender e
desaprender sobre a vida, e
porque o amor é dois*

AGRADECIMIENTOS

A los miembros de mi comité tutorial:

Dra. Alejandra Bravo
Dra. Patricia Joseph
Dr. Agustín Guerrero
Dra. Susana López

Por sus comentarios y sugerencias, los cuales fueron de gran ayuda en el desarrollo de este proyecto.

A Agustín por su amabilidad y paciencia, a Alejandra por sus consejos fluorescentes y nuestras últimas conversaciones, a Susana por enseñarme que el mundo de la ciencia es algo divertido.....

A los miembros del Jurado por sus comentarios y por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

Dra. Alejandra Bravo
Dra. Lourdes Gutierrez
Dra. Susana López
Dra. Gloria Saab
Dr. Luis Cárdenas
Dr. Celso Ramos
Dr. Federico Sánchez

Entre nacer y morir ocurre una vida (O.Paz). Y como la vida se va nutriendo de las experiencias que en ella tenemos, quiero recordar y así agradecer a todas las personas que compartieron conmigo un pedazito o muchos pedazitos de vida y de alguna forma aprendí.... A mi familia por su apoyo y confianza... al Dr. Cazorla por ser maestro y amigo, a mis profesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por sus enseñanzas y por demostrar al mundo que se puede investigar en condiciones adversas...al Dr. Quintero por su tarea de divulgación de la Biotecnología, por ser mi primer contacto en Mexico y por sus muestras de afecto y preocupación en diferentes momentos... A todas las personas con las que intercambie amistad, todas ellas son especiales para mí y en su momento marcaron la diferencia en mi vida... Sofía, Jane, Rosita, Giovanni, Carla, Cris, el oso, el loco Juan, el gordo, el loco carcamo, Bruna, Olenka, Martín ...por sus mails durante estos años, por toda nuestra historia universitaria de sueños en todo sentido pero sobretodo, nuestro deseo de un mundo más igualitario... Cinthia, Luis, Mariela, Angélica y Rosaura por su aceptación, respeto, y cariño... Claudia por los buenos momentos compartidos... Jimena, por los sueños, las estrellas, la terraza o el jardín, incluyo a Selene en los desayunos, las cenas, las pláticas nocturnas, por la compañía y el cariño ... A Susana por aceptarme como parte de su grupo de trabajo, por sus enseñanzas y consejos a lo largo de estos 4 años, a Carlos por sus críticas y palabras de aliento en diferentes momentos durante este proyecto, a Pedro por el saludo cariñoso de cada mañana, a Rafa por su honestidad y apoyo en diferentes circunstancias, a Ernesto por su honestidad y amistad, a Pavel por su compañerismo y el voley; a todos ellos por compartir con nosotros su gusto por enseñar y su motivación en esto de investigar. A mi juicio estas personas constituyen las estructuras del laboratorio, los estudiantes somos como los muebles y adornos en una casa, algunas veces coordinan bien, otras no tanto, sin embargo uno aprende y comparte buenos momentos...por ello recuerdo a los que fueron y son parte del grupo Ariás-López.....A Kerstín, Alex, Vera, Carlos Arturo, Lizpa, Barbara Selisko, Jessica y Mar, por las risas, reflexiones y cultura compartida en nuestra estancia en Mexico.a todos los del voley (Alma, Rosi, Takuya, Fer, ...) por las cáscaras y las risas. ...a las diferentes personas del IBT que me brindaron un saludo o una sonrisa sincera, con ello muchas veces cambiaron el clima en mi corazón. ...Por último, a todas las personas sencillas, de mente abierta por ser un ejemplo que deseo alcanzar.

“Una se despide insensiblemente de pequeñas cosas lo mismo que un árbol en tiempo de otoño se queda sin hojas”

INDICE

	PAGINA
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	4
GENERALIDADES	5
CARACTERISTICAS GENERALES	6
PROTEINAS ESTRUCTURALES	10
CICLO DE REPLICACION	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y METODOS	27
RESULTADOS	33
DISCUSION	52
CONCLUSIONES	61
PERSPECTIVAS	63
REFERENCIAS	66
APENDICE	73
ARTICULO	
PREMIO FUNDACION GLAXO-WELLCOME 2000	

RESUMEN

El calcio cumple un papel preponderante en diversas del ciclo de replicación de los rotavirus. En este trabajo se encontró que la infectividad de los rotavirus es dependiente de la concentración de calcio durante las etapas iniciales de la infección. El aumento de cinco veces la concentración de calcio en el medio de cultivo, ocasiona un incremento de la infectividad que varía entre 2 y 50 veces dependiendo de la cepa de rotavirus que se estudie. Nuestros resultados indican que el efecto del calcio es sobre la partícula viral y es específico de este ión, ya que otros iones divalentes no lo presentan (con excepción del estroncio). Además este efecto es general para los rotavirus, tanto cepas de origen animal como cepas de origen humano.

Se encontró que en una concentración de 10 mM de calcio, la infectividad de virus de origen animal (sensibles a neuraminidasa) es menos dependiente de la presencia de ácido siálico en la superficie de la célula para llevar a cabo una infección eficiente. En estudios de la fluorescencia intrínseca de la partícula viral, se encontró que el aumento de la concentración de calcio en el medio ocasiona un cambio conformacional en la partícula viral, que permite la exposición de nuevas regiones en las proteínas virales de la capa externa, lo cual se evidenció por la exposición de un mayor número de triptofanos en calcio alto. La caracterización de este fenómeno, el cuál no ha sido descrito previamente, sugiere que la concentración de calcio en el medio induce un cambio conformacional en la partícula viral que la estabiliza y que favorece una interacción virus-célula mas eficiente, con el consecuente aumento de la infectividad del virus.

Los rotavirus son la causa principal de gastroenteritis severas en niños menores de dos años de edad y se ha estimado que una vacuna efectiva contra estos virus podría evitar cerca de 800 muertes de infantes cada año. Estos virus tiene un tropismo celular muy particular, infectan unicamente las células de las puntas de las vellosidades intestinales, y en el tracto digestivo las células epiteliales están expuestas a diferentes concentraciones de calcio dadas por la ingesta de este ión en los alimentos. Estos datos en conjunto, muestran la importancia de la concentración extracelular de calcio en la patogénesis de los rotavirus

ABSTRACT

The replication cycle of rotavirus are strongly dependent on the concentration on the calcium in the environment. In this work, we found that a 5-fold increase over the basal calcium concentration of the cell-culture medium, resulted in an increase titer in all rotavirus tested, the magnitude of enhancement was different depending on rotavirus strain, this change between 2 and 50 fold over control in 2 mM calcium. This effect is mainly on the viral particle and its specific for this virus, since reovirus and poliovirus do not present the same effect, and its general for rotaviruses of animal or human origins.

We found that incubation of neuraminidase-sensitive animal rotavirus strains with 10 mM Ca^{2+} increases their infectivity in neuraminidase treated cells, and renders the viruses less dependent on the presence of sialic acid on the cell. The exposure of the virus particles to this calcium concentration produces a change in the tryptophan fluorescence emission spectra of the purified triple layered particles (TLPs), but not in that of the double-layer particles (DLPS), suggesting that the conformational change induced for calcium is in the proteins of the viral capsid (VP4 and VP7). These findings suggest that the detected conformational change might be responsible to increase rotavirus infectivity, for facilitating the interaction of different rotaviruses with cell receptors other than sialic acid.

Rotaviruses are the major cause of severe acute diarrhoea of infants under two years of age. These agents have a very specific cell tropism, infecting only the enterocytes on the tip of intestinal villi, and in the digestive tract the epithelial cells can be exposed to wide variation in calcium concentration. Taken together, these data show the importance of extracellular calcium in the pathogenic rotavirus-host interaction. And the other hand, the results found in this work might prove to be useful, for the growth of human rotavirus strains that typically are fastidious to work with, given their low infectious titer in tissue culture.

INTRODUCCION

*Este es un amor que tuvo su origen
y en un principio no era sino un poco de miedo
y una ternura que no quería hacer y hacerse fruto....
Efraín Huerta (Mexico)*

1.1 GENERALIDADES

Los rotavirus en humanos fueron descubiertos por Bishop y col. en 1973 (10), mediante la observación al microscopio electrónico de biopsias duodenales provenientes de pacientes pediátricos hospitalizados por gastroenteritis aguda no bacteriana. Al microscopio electrónico, las partículas virales tienen la apariencia de una rueda de carreta, por lo que se las bautizó con el nombre de rotavirus, del latín rota, que significa rueda (32). Desde entonces, estos virus han sido reconocidos como el principal agente etiológico causante de gastroenteritis viral en niños menores de 2 años y en las crías de muchas especies animales, incluyendo algunas de importancia económica para el hombre (31).

Los rotavirus causan una enfermedad que se caracteriza por diarrea acuosa, fiebre y vómito con una duración aproximada de una semana (11). La severidad de la enfermedad varía desde una infección asintomática hasta una gastroenteritis deshidratante severa que puede llevar a la muerte. El tropismo de los rotavirus está limitado a las células epiteliales del intestino delgado en donde se replican y producen citólisis. Los efectos secundarios de la infección son deshidratación y desbalance electrolítico (58). La principal ruta de transmisión de los rotavirus es fecal-oral, aunque también se han especulado otras vías de transmisión de estos virus, como el contacto persona-persona, el contacto con secreciones respiratorias, y/o el contacto con superficies contaminadas, ya que la frecuencia de infección por estos virus es independiente de las condiciones higiénicas y sanitarias (34). En general, la transmisión de la enfermedad es especie-específica ya que no existen indicios de que ocurra transmisión entre el hombre y animales; sin embargo estudios de hibridación ARN-ARN han mostrado que algunas cepas de rotavirus aisladas de humanos son recombinaciones entre cepas de origen humano y cepas de origen animal (86), lo que sugiere que puede haber transmisión interespecies.

En países en desarrollo los rotavirus son causantes del 35-70% de las hospitalizaciones por diarrea severa, lo cual resulta en aproximadamente 800,000 muertes anuales por deshidratación en niños menores de 2 años (53, 58). Los rotavirus son responsables del 25% de muertes asociadas con diarrea en el mundo y son responsables del 6% de muertes de niños menores de 5 años de edad (53). Es importante resaltar que a pesar de las diferencias en las medidas de salubridad del agua y las medidas higiénicas convencionales

de los diferentes países del mundo, la frecuencia de infección por estos virus es muy similar a nivel mundial; se estima que a la edad de 5 años, el 95% de los niños han sido ya infectados al menos una vez por estos virus, sin embargo la mortalidad debida a las infecciones por rotavirus es mayor en países en desarrollo que en países desarrollados (58).

Los anticuerpos maternos de la clase IgG transmitidos a través de la placenta, no protegen al recién nacido contra la enfermedad (116), pero los recién nacidos alimentados con leche materna presentan una protección parcial contra las infecciones de rotavirus, probablemente mediante los anticuerpos específicos tipo IgA transmitidos por la madre (55), sin embargo, estos anticuerpos tienen una vida media muy corta (53). La lactancia materna parece posponer la infección por rotavirus hasta después de los seis meses de edad, pero la epidemiología de la enfermedad sugiere que la inmunidad natural no previene las reinfecciones por estos virus (112). El pico de incidencia de la infección por rotavirus ocurre entre los 6 y 24 meses de edad, aunque en países en vías de desarrollo la primera infección puede ser antes (53). Actualmente no existe una vacuna que proteja eficientemente de la infección por rotavirus; de aquí la importancia del conocimiento de la biología de estos virus y de los mecanismos inmunológicos del huésped, que eventualmente permitan el desarrollo de medidas de prevención efectivas.

1.2. CARACTERISTICAS GENERALES



Partícula viral

Los rotavirus comprenden un género dentro de la familia *Reoviridae*, son virus que no tienen envoltura lipídica, presentan una geometría icosaédrica y tienen aproximadamente 76 nm de diámetro. El virión maduro está constituido por tres capas concéntricas de proteínas, dentro de las cuáles se encuentra un genoma segmentado formado por 11 moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc) (94).

La capa externa del virión está formada por las proteínas VP7 y VP4. La superficie lisa del virus está compuesta por 780 copias de la proteína VP7, que se encuentra estructurada en forma de trímeros (122). La proteína VP7 une calcio y aparentemente la interacción con este ion estabiliza la organización trimerica de esta proteína (24). Partiendo de esta superficie lisa se proyectan 60 espículas de 12 nm de longitud, formadas por dímeros de la

proteína VP4 (93). La capa intermedia consta de 260 trómeros de la proteína VP6 y la capa interna, está formada por 60 dímeros de la proteína VP2 (62), que esta asociada con la proteínas VP1 y VP3 en su cara interna, y contiene al genoma viral (Figura 1).

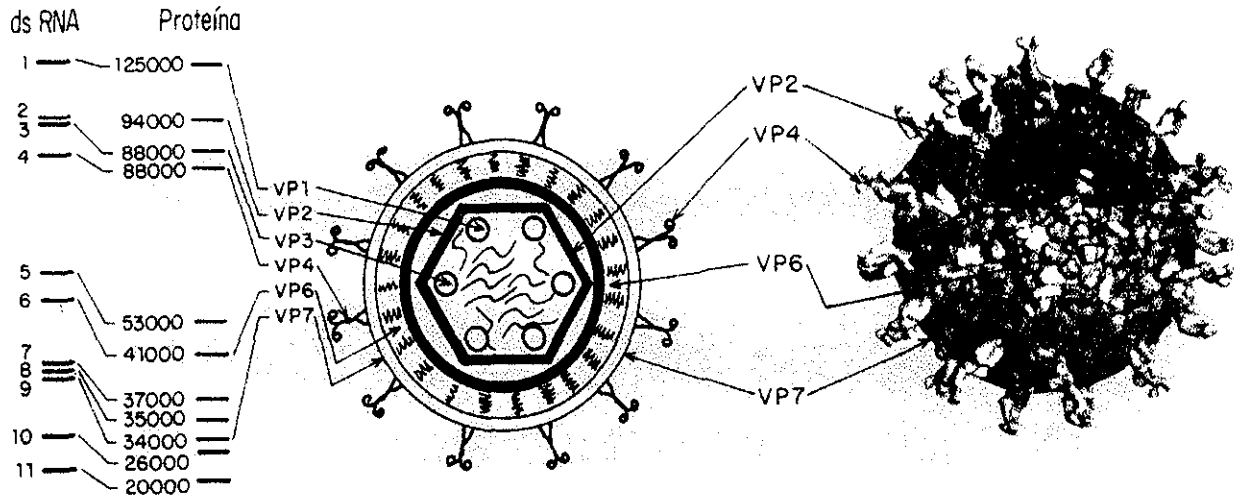


Figura 1: Representación esquemática de los rotavirus. Se muestra la estructura tridimensional de las partículas virales determinada por criomicroscopía electrónica y procesamiento de imágenes. Se indican las proteínas estructurales codificadas por su respectivo segmento de ARN.

Genoma

El genoma viral esta constituido por 11 segmentos de ARNdc cuyo tamaño varía de 667 a 3302 pares de bases (pb), que en su conjunto constituyen un genoma de aproximadamente 18,500 pb (31, 87). La separación electroforética de estos segmentos presenta un patrón característico (electroferotipo), que ha dado lugar a un sistema de diagnóstico denominado, electroforetipificación.

Todos los genes de rotavirus presentan en sus extremos secuencias no traducidas de longitud variable, que son muy conservadas entre los segmentos equivalentes entre distintas cepas. En general, estas secuencias no traducidas flanquean un marco abierto de lectura que codifica para una sola proteína, excepto el segmento 11 que presenta dos marcos abiertos de lectura y codifica para dos proteínas. La función de estas secuencias no traducidas se desconoce, sin embargo, se piensa que son el sitio de unión de proteínas

virales que interaccionan con el ARN durante la transcripción, replicación y empaquetamiento del genoma (89). Cada partícula viral contiene 11 segmentos de ARN, lo que indica que la replicación y el empaquetamiento del genoma debe ser un proceso coordinado de manera muy eficiente.

La hebra positiva de cada segmento de ARNdc contiene CAP en el extremo 5' (31), pero a diferencia de los ARNm celulares, no contiene poly(A) en su extremo 3' (78). En general, la secuencia nucleotídica de los genes de rotavirus es rica en A/T (58-67%) y con excepción del segmento 11, todos contienen un solo marco abierto de lectura. El primer codón de inicio de la traducción mantiene las características del consenso de Kozak (ACCATGG....) (60), con excepción del segmento que codifica para la proteína VP7.

En el rotavirus SA11, las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7 son codificadas por los genes 1, 2, 3, 4, 6 y 9 respectivamente. Los 5 genes restantes (segmentos 5, 7, 8, 10 y 11) codifican para seis proteínas no estructurales (NSP1 a NSP6), las cuáles no forman parte del virión y se sintetizan en la célula infectada durante la replicación del virus. Las propiedades específicas de cada una de las proteínas no estructurales no se conoce con precisión, sin embargo, algunas características como su carga positiva y la capacidad de unir ARN, sugieren que sus funciones están relacionadas con el control de la síntesis de proteínas virales, con la replicación del genoma y con la maduración de la partícula viral en el interior de la célula (87).

Tipos de partículas virales

Al microscopio electrónico se observan tres tipos de partículas con características estructurales y funcionales diferentes:

- La partícula completa o virión maduro, que contiene las tres capas proteicas se le denomina TLP del ingles "Triple-Layered Particle" y que es infecciosa.

- La partícula que contiene dos capas proteicas o DLP "Doble-Layered Particle"; que no es infecciosa, pero presenta actividad de transcripción. Este tipo de partículas se pueden generar *in vitro* a partir de las TLPs mediante tratamiento con agentes quelantes de calcio (15).

- Las partículas que contienen una sola capa proteica o nucleocápside, que tienen la actividad de replicar el genoma viral. Estas partículas se generan *in vitro*, mediante el tratamiento de las DLPs con agentes caotrópicos, como tiocianato de sodio o altas concentraciones de calcio (1.5 M) (15) (Figura 2)

Estos tres tipos de partículas presentan diferentes propiedades fisicoquímicas. Debido a su diferente densidad se pueden separar mediante gradientes de cloruro de cesio; las TLPs tienen una densidad de 1.36g/cm³, las DLPs 1.38 g/cm³ y las nucleocápsides 1.44 g/cm³ (8), y debido a sus diferentes tamaños, estas partículas también se pueden separar en geles de agarosa (39).

Las partículas completas de rotavirus o TLPs son relativamente estables; son infecciosas en un rango de pH de 3 a 9 (30), y el virus es estable por meses a 4°C, cuando se mantiene en buffers con una concentración mínima de 1.5 mM de las sales de CaCl₂ o SrCl₂ (104).

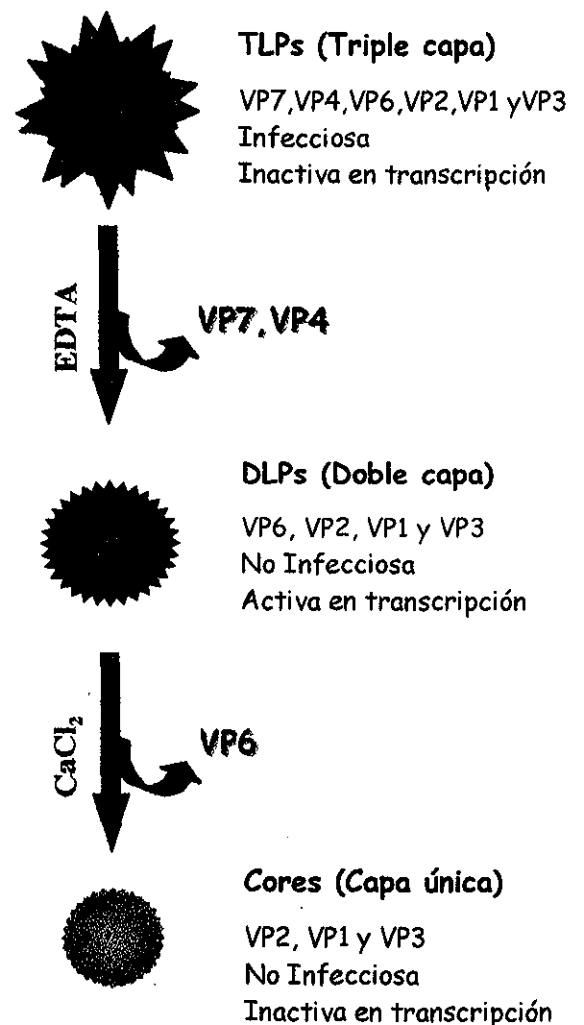


Figura 2: Representación esquemática de las partículas de rotavirus. Se muestran las propiedades estructurales y biológicas de cada partícula.

1.3. PROTEINAS ESTRUCTURALES

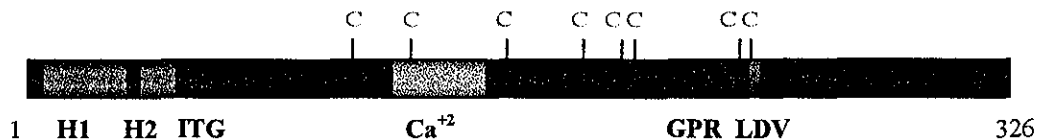


Proteínas de la capa externa

Como ya se mencionó, la capa externa de los rotavirus, esta formada por las proteínas VP7 y VP4, que son las proteínas responsables de las primeras interacciones del virus con la célula.

VP7 es la segunda proteína más abundante en el virión, es altamente inmunogénica e induce la producción de anticuerpos neutralizantes. Es una glicoproteína, que contiene únicamente oligosacáridos del tipo alta manosa (3, 27, 56).

En la figura 3, se muestra un diagrama con las características principales de la proteína VP7. La secuencia nucleotídica del gen para VP7 predice un marco abierto de lectura de 326 aa que inicia con una secuencia de Kozac débil (60), sin embargo 30 nucleótidos después se encuentra un segundo codón de inicio en fase, con una secuencia de inicio fuerte. Ambos codones de inicio preceden regiones hidrofóbicas (H1 y H2, aa 6-23 y aa 33 a 44 respectivamente) que son altamente conservadas entre las diferentes cepas de estos virus y que tienen el potencial de funcionar como péptido señal para dirigir la síntesis de VP7 hacia el retículo endoplásmico (92). El extremo amino terminal de la proteína madura empieza en la glutamina 51, ya que el péptido señal es cortado entre la alanina 50 y la glutamina 51 (108). La proteína VP7 es retenida en el RE, aunque no contiene la secuencia consenso de retención en RE (KDEL) (85), sin embargo se ha propuesto que los aminoácidos (aa) ITG (59-61) podrían ser responsables de su retención en el RE (72). La proteína VP7 del rotavirus de simio SA11 tiene un sólo sitio de glicosilación localizado en el aa 69 (3). Además de la glicosilación, la maduración de VP7 depende de la formación de puentes disulfuro intramoleculares (111), y de la presencia de iones calcio. Se ha reportado un sitio potencial de unión a calcio entre los aa 124-155. Sin embargo, al analizar variantes de rotavirus resistentes a bajas concentraciones de calcio en el medio, se vió que este fenotipo segrega con el gen que codifica para VP7 y esta dado por la presencia de una prolina en la posición 279 (38), posición fuera del sitio potencial de unión a calcio. Recientemente se encontró que la secuencia de esta proteína tiene dos sitios potenciales de unión a integrinas (LDV y GPR), los cuáles son ligandos de las integrinas $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_x\beta_2$ (16) respectivamente, aunque la funcionalidad de estos sitios no ha sido demostrada.



H1 y H2: regiones hidrofóbicas
 ITG: secuencia de retención en el retículo endoplásmico
 Ca²⁺: sitio potencial de unión a calcio
 GPR y LDV: sitios de unión a integrinas
 C: cisteína

Figura 3 : Representación esquemática de la proteína VP7. Se indican los dominios más relevantes de esta proteína.

El papel de VP7, en las primeras interacciones de rotavirus con su célula huésped aún no se ha determinado. Sin embargo se sabe que VP7 puede afectar la expresión de diferentes fenotipos de VP4, probablemente porque estas dos proteínas VP4 y VP7 interactúan íntimamente en la superficie del virión. El análisis de rotavirus recombinantes cuyas proteínas de capa externa provienen de diferentes cepas, ha revelado que la reactividad de anticuerpos monoclonales específicos para VP4 puede modificarse dependiendo del origen de la proteína VP7 (14). Adicionalmente, se ha reportado que la expresión de ciertos fenotipos como son la capacidad de formar placa, el tamaño de la placa y la especificidad de unión al receptor (características determinadas por VP4), se afecta por el fondo genético en los virus recombinantes, especialmente del origen de las proteínas de la capa externa (13, 79, 119).

VP4, es una proteína no glicosilada de 776 aa (88 KDa), codificada por el segmento 4 de ARNs. A esta proteína se le atribuyen funciones esenciales en el ciclo de replicación de los rotavirus, las que incluyen, la unión al receptor y la penetración a la célula. Además, esta proteína es inmunogénica e induce inmunidad protectora en ratones.

En la figura 4 se esquematizan los distintos dominios funcionales de VP4. La infectividad de los rotavirus depende del tratamiento proteolítico del virus con tripsina. Esta enzima corta a VP4 en las argininas de las posiciones 231, 241 y 247, generando dos polipéptidos llamados VP8 (aa 1-231) y VP5 (aa 247-776) (4, 68), estos sitios de corte se encuentran conservados en todas las cepas de rotavirus. El tratamiento de los virus con tripsina no afecta la unión del virus a la célula, por lo que se ha propuesto que el corte proteolítico está relacionado con un paso posterior, posiblemente la penetración del virus al

citoplasma celular (57). El mecanismo por el cual el corte con tripsina activa la infectividad aún no se conoce; sin embargo, en estudios de criomicroscopía electrónica se ha observado que en virus cortados con tripsina las espículas de VP4 se ven claramente, mientras que en virus no cortados con tripsina, éstas no se observan bien definidas, lo que sugiere que tienen una conformación más flexible. En base a estas observaciones, se ha propuesto que el corte proteolítico del virus con tripsina estabiliza la conformación y el ensamble de las espículas de VP4 en la partícula viral (17).

Algunas cepas de origen animal tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos, lo cual se debe a la interacción de VP4 con residuos de ácido siálico (AS) presentes en la membrana del eritrocito. El dominio responsable de esta interacción se encuentra en el fragmento VP8 de la proteína VP4 (aa 98-203) (35), específicamente en los residuos Tyr-155, Tyr-188 y Ser-190, que son fundamentales para esta interacción (52).



HA: dominio de hemaglutinación
DGE: sitio de unión a la integrina $\alpha_2\beta_1$
RH: región hidrofóbica
C: cisteína

Figura 4: Representación esquemática de la proteína VP4. Se indican los dominios más relevantes de la proteína.

Por otro lado, se ha demostrado que la proteína VP5 se une específicamente a las células (125), a través de la secuencia DGE presente en la posición 308-310 en VP5 que interacciona con la integrina $\alpha_2\beta_1$ (16, 124) que se encuentra en la superficie celular. También se ha identificado una región hidrofóbica entre los aa 384 y 404 de VP5, la cual comparte homología con el dominio de fusión de los alfavirus (Sindbis y Semliki) (73); *in vitro* se ha observado que esta región tiene la actividad de permeabilizar liposomas (25), sin embargo, su funcionalidad *in vivo* aún no ha sido demostrada. En base a estudios de predicción de la estructura secundaria de VP4, se ha visto, que esta proteína tiene un

dominio rico en α -hélices hacia su extremo carboxilo, que presenta un motivo de héptadas repetidas (aa 494-557) que son típicas de las estructuras de “coiled-coil” , las cuales posiblemente esten involucradas en la dimerización de la proteína (69).



Proteína de la capa intermedia

VP6 es una proteína hidrofóbica de 397 aa (44 KDa), que juega un papel preponderante en la estructura de los rotavirus, ya que esta en contacto tanto con las proteínas de la capa externa (VP4 y VP7) como con la proteína VP2 de la nucleocápside del virus (95). Además esta proteína es muy inmunogénica, y debido a que comparte epítopes conservados entre diferentes cepas de rotavirus es el blanco antigénico en los ensayos de diagnóstico inmunológico para los rotavirus (29). Una función importante de VP6 es la de integrar el complejo de transcripción viral (junto con las proteínas de la nucleocápside). Aparentemente su función es más bien estructural, ya que aún no se ha reportado que esta proteína tenga alguna actividad de transcriptasa (8, 100).



Proteínas de la nucleocápside

La nucleocápside esta formada por las proteínas VP1, VP3, y mayoritariamente, por la proteína VP2. Estas proteínas en conjunto tienen la actividad de replicación.

VP1, es una proteína minoritaria del virus (12 copias por virión). Tiene 1088 aa y se ha propuesto que es la ARN polimerasa dependiente de ARN, debido a que en su secuencia contiene regiones de homología con motivos conservados en las ARN polimerasas dependientes de ARN de otros virus (87).

VP2, es la proteína más abundante en la nucleocápside viral, se encuentra en forma de dímero constituyendo la capa interna del virus. Es un proteína de 881 aa, que es capaz de unir ARN y su presencia es esencial para la actividad de replicación (75).

VP3, es una proteína de 835 aa y al igual que VP1 existen muy pocas copias de este polipéptido por virus. A VP3 se le atribuye la función de guanililtransferasa, dada su capacidad de unir GTP, de unirse a ARN de cadena sencilla pero no a ARNdc y porque en

su secuencia contiene motivos estructurales que se han encontrado en otras guanilil transferasas (67, 88, 90).

1.4. CICLO DE REPLICACION

In vivo, los rotavirus infectan únicamente los enterocitos diferenciados de las puntas de las vellosidades del intestino delgado de su huésped, e *in vitro* sólo infectan eficientemente líneas celulares de origen renal e intestinal (58), por lo que se considera que estos virus tienen un alto tropismo celular. La información acerca de la biología de los rotavirus se ha caracterizado principalmente en la línea celular MA104, derivada de células epiteliales de riñón de mono, y que es una de las más susceptibles a la infección por estos virus. La replicación de los rotavirus es exclusivamente citoplasmática y tienen la particularidad de ser los únicos virus que maduran en el RE (19).

Los rotavirus inician su infección mediante la unión de las proteínas de la capa externa con el receptor(es) presente(s) en la membrana de su célula huésped. Después de la unión, los rotavirus penetran al citoplasma celular y en su paso al interior, los virus pierden las proteínas de la capa externa e inician la transcripción de su genoma. El ARNm recién sintetizado por la ARN polimerasa viral, cumple dos funciones: es utilizado para la síntesis de las proteínas virales o como templado para la síntesis de la hebra complementaria durante la replicación del genoma (ARNdc). La selección, empaquetamiento y replicación de los segmentos del genoma, así como la morfogénesis de las partículas de doble capa (DLPs), se lleva a cabo en el citoplasma, en regiones electrodensas compuestas de ARN y de proteínas virales, a las que se denomina viroplasma. Las DLPs que se forman en el viroplasma y geman a través de la membrana del RE, debido a un reconocimiento entre la VP6 presente en las DLPs y la proteína no estructural NSP4, presente en la membrana del RE. Durante el proceso de gemación los virus son envueltos por una membrana lipídica transitoria que se pierde conforme las partículas migran dentro del RE y ésta es reemplazada por las proteínas de la capa externa (VP4 y VP7), por un mecanismo aún no descrito. Finalmente los viriones maduros son liberados de la célula por lisis (29) (Figura 5).

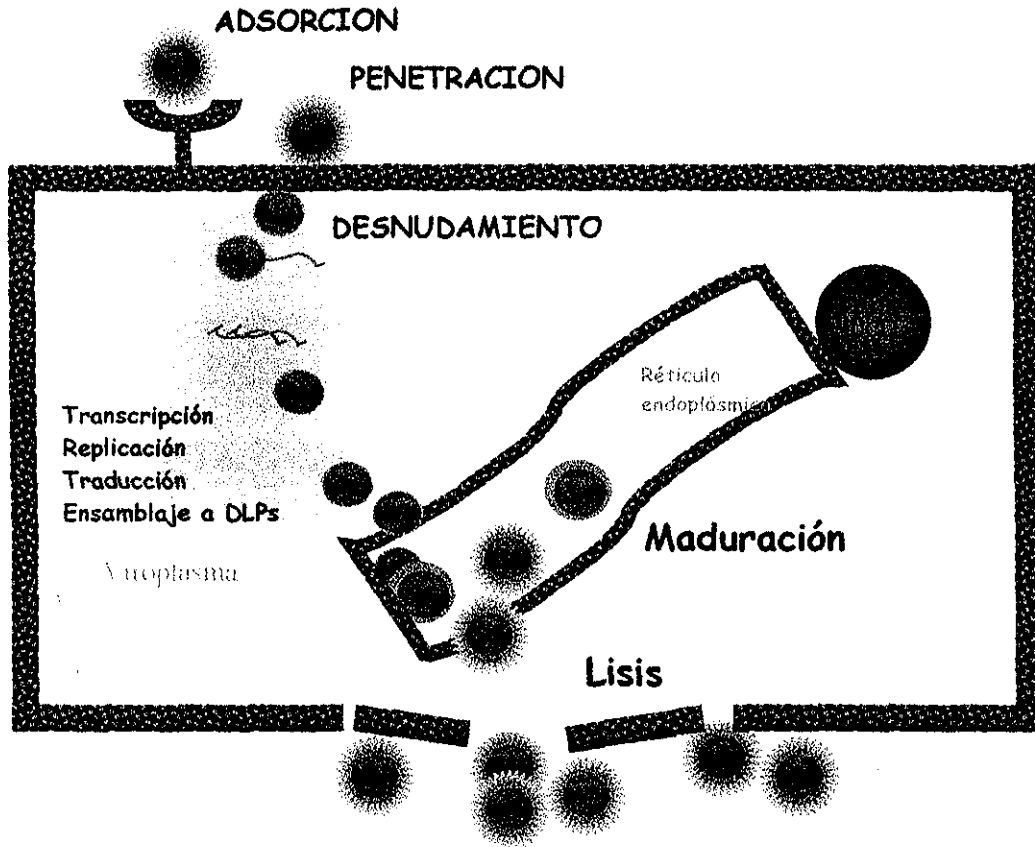


Figura N° 5: Representación esquemática del ciclo de replicación de los rotavirus. Se indican las diferentes etapas del ciclo replicativo y los compartimentos donde se realizan.

I.5. PRIMERAS INTERACCIONES DEL VIRUS CON SU CELULA HUESPED

Las etapas iniciales del ciclo de replicación de rotavirus, se pueden definir como: 1) Adsorción del virus a la superficie celular, 2) Penetración del virus al citoplasma celular, 3) Desnudamiento de la partícula viral e inicio de la transcripción del genoma viral.

1) Adsorción del virus a la superficie celular

Un virus se adhiere a la membrana de su célula huésped mediante una interacción específica entre la o las proteínas virales de adsorción (VAPs), que son únicas para cada virus y una o varias moléculas celulares que actúan como receptores. La especificidad y afinidad de la interacción de las VAPs con el o los receptores contribuyen al rango de

huésped y especificidad de tejido, por lo que la expresión del receptor sobre la superficie celular correlaciona con la susceptibilidad de una célula para la infección (117).

En el caso de los rotavirus, las dos proteínas de la capa externa, VP4 y VP7 han sido asociadas al proceso de adsorción (6, 16, 36, 37, 79, 124, 125). La adsorción de algunos rotavirus (de origen animal) a su célula huésped es disminuída drásticamente por el tratamiento de las células con neuraminidasa (NA) (7, 36, 59), que es una enzima que corta residuos de ácido siálico (AS). Además, la preincubación de estos virus con glicoforina (glicoproteína que contiene residuos de AS) ocasiona una disminución en la unión de los virus a la célula (123). Estas observaciones indican la dependencia de estos virus por la presencia de AS en la membrana celular, y sugieren que el receptor para algunos rotavirus de origen animal es una molécula celular que contiene AS (80). Sin embargo, se han aislado variantes a partir de rotavirus de origen animal (sensibles a NA), que ya no requieren la presencia de AS para infectar a su célula huésped (70, 80) y se sabe que la infectividad de los rotavirus de origen humano no es afectada por el tratamiento de las células con NA (36). Estos datos en conjunto, sugieren que la interacción inicial de los rotavirus con alguna molécula celular con AS, accesibles a NA, no es esencial para que estos virus infecten a las células (80). Por otro lado, dado que en general los rotavirus (de origen animal y de origen humano) infectan a los mismos tipos celulares, se ha propuesto que independientemente del requerimiento inicial de AS, la ruta que utilizan los rotavirus para infectar a la célula es la misma (81).

Recientemente se ha propuesto que la unión de los rotavirus a la célula es un proceso de múltiples pasos, donde ocurren al menos tres contactos entre el virus y la superficie celular antes que éste ingrese al citoplasma (81). En concordancia con esta hipótesis, se han reportado distintas moléculas celulares que interaccionan con el virus durante la unión de éste a la célula, éstas son: los gangliósidos GM1 y GM3 (46, 97) y las integrinas $\alpha_2\beta_1$ y $\alpha_4\beta_1$ (Coulson, 97. Hewish, 2000, Zarate 2000b); sin embargo aún no es clara la función que cumplen estas moléculas durante el proceso de infección de los rotavirus.

En nuestro laboratorio, se aislaron variantes del rotavirus de simio RRV (sensible a NA) que ya no requieren de la presencia de AS para infectar a las células, a las que se denominó nar (del inglés "neuraminidase resistant") (80). Posteriormente, en estudios de caracterización de la unión del virus RRV y su variante nar a las células MA104, se demostró que los rotavirus tienen por lo

menos, dos dominios de unión a la célula, uno en VP8 que interacciona con alguna molécula celular que contiene AS (aún no definida) y otro en VP5 que se une a un receptor que no contiene AS (80, 124, 125). Recientemente, Zárate y col, demostraron que la variante nar se une a la integrina $\alpha_2\beta_1$ sobre la membrana de las células MA104, a través del motivo DGE que se encuentra en VP5. Por otro lado, se sabe que anticuerpos dirigidos contra la proteína VP8, la proteína VP5 o la integrina $\alpha_2\beta_1$ no inhiben la unión a la célula del rotavirus humano Wa (datos no publicados). Sin embargo se ha reportado que Wa compite la infectividad de RRV y de nar3, aunque estos virus no compiten la infectividad de WA, lo que evidencia una tercera interacción aún no identificada (mendez, 1999).

El modelo que se ha propuesto en base a los resultados anteriores, es que el rotavirus RRV se une inicialmente a un receptor aún no identificado que contiene residuos de AS a través de VP8 y después de esta interacción, se une a la integrina $\alpha_2\beta_1$ a través de VP5. La variante nar es capaz de unirse directamente con la integrina $\alpha_2\beta_1$, a través de su proteína VP5 (124). Los rotavirus de origen humano probablemente se unan a una tercera molécula celular y esta interacción puede representar un paso común en la infección para los diferentes rotavirus (81).

2) Penetración del virus al citoplasma celular

Durante una infección viral el paso siguiente a la adsorción es la penetración o entrada del virus al citoplasma celular con el consecuente desnudamiento de la partícula viral. El atravesar la membrana celular no es un proceso simple y los virus utilizan diversas estrategias de entrada, las cuales no son del todo entendidas. Durante su entrada al citoplasma celular, los viriones sufren cambios conformacionales después de un paso de “activación” (exposición a pH ácido, interacción con su receptor, presencia de iones, etc.) que resultan en un incremento de su hidrofobicidad que facilita su interacción con la membrana celular y, consecuentemente su penetración al citoplasma.

Muchos virus envueltos como Sendai virus, el virus de sarampión o el virus sincitial respiratorio atraviesan la membrana celular por fusión directa de la membrana viral con la membrana plasmática a pH neutro. Otros virus envueltos ingresan al citoplasma por endocitosis, y después de que el virus es endocitado por la célula, se fusionan las membranas viral y endosomal. En general, esta fusión es promovida por cambios conformacionales de las proteínas

virales que ocurren por la exposición al pH ácido del endosoma (la entrada del virus influenza al citoplasma de la célula por endocitosis, es el mecanismo de entrada mejor estudiado). En el caso de los virus no envueltos, se desconoce el mecanismo molecular de la penetración; sin embargo, se ha propuesto que uno de los mecanismos podría ser la penetración directa de la membrana celular y este mecanismo ha sido descrito para algunos virus no envueltos como, adenovirus, poliovirus y las partículas subvirales intermedias (ISVss) de reovirus (33).

El mecanismo por el cual rotavirus penetra a la célula es controversial (29). Sin embargo, se sabe que el corte proteolítico de la proteína VP4 por tripsina es necesario para la entrada del virus al citoplasma celular (37, 57). Se han propuesto dos formas de entrada: 1) penetración directa, y 2) endocitosis mediada por receptor. Estudios de microscopía electrónica muestran viriones en vesículas endocíticas, lo que sugiere que la entrada de rotavirus pudiese ocurrir por endocitosis y que el desnudamiento de la partícula viral se pudiese llevar a cabo por efecto de las enzimas lisosomales (71). Sin embargo, agentes lisomotrópicos, como cloroquinona o cloruro de amonio, que alteran el pH de la vesícula endocítica, no tienen efecto sobre la infectividad viral, lo cual sugiere que el posible pasaje de rotavirus de la vesícula endocítica al citoplasma no ocurre por mecanismos de fusión dependientes de pH, como se ha sugerido para otros virus no envueltos de la familia Reoviridae (reovirus tipo III) y Picornaviridae (poliovirus, rinovirus y virus de la fiebre aftosa) (37, 57, 71). Por otra parte, inhibidores metabólicos (azida de sodio y dinitrofenol) que bloquean la endocitosis, tampoco afectan significativamente la infección por rotavirus, lo cual sugiere que la endocitosis no es la principal vía de entrada de la partícula infecciosa (57).

Por otro lado, existen reportes que apoyan a la penetración directa a través de la membrana plasmática, como la principal ruta de entrada de virus infecciosos (los tratados con tripsina), con la subsecuente liberación de las DLPs hacia el citoplasma. En estos trabajos se propone también que los virus no activados con tripsina (partículas no infecciosas), ingresan a la célula por endocitosis y son secuestrados en vesículas endocíticas, dando lugar a una infección no productiva (109). Estudios de cinética de entrada del rotavirus de simio (RRV), muestran que virus activados con tripsina son internalizados con un tiempo medio de 3 a 5 minutos, mientras los no activados desaparecen de la superficie de la membrana con un tiempo medio de 30 a 50 minutos (57). Adicionalmente, se ha reportado que células poco permisivas a la infección por rotavirus, como las células L, al ser tratadas con drogas que inhiben endocitosis incrementan su permisividad a la infección de este virus, lo cual sugiere que el proceso de endocitosis es una

posible ruta de secuestro que origina una infección no productiva en estas células (5). Estos datos apoyan la hipótesis que las partículas infecciosas ingresan a la célula por penetración directa de la membrana celular, aunque no existe una demostración directa de que éste sea el mecanismo.

Recientemente se reportó que, sin importar la molécula que utilicen los virus dependientes e independientes de AS en su primer contacto con la célula, ambos tipos de virus interaccionan con la integrina $\alpha_v\beta_3$ (44) y la proteína de choque térmico Hsc70 (43) en un paso posterior a su primera unión con la célula. Por otro lado, se evidenció que el secuestrar colesterol de la membrana celular reduce la infectividad de los virus RRV, nar3 y Wa (dependiente e independiente de AS) en más de un 90%, sin afectar su unión a la superficie celular (45). esto sugiere que el(los) receptor(es) de rotavirus podrían formar parte de microdominios lipídicos en la membrana celular a los que recientemente se ha denominado rafts o balsas, éstas son regiones discretas constituidas por colesterol, glicoesfingolípidos y glicoproteínas específicas y pueden actuar como plataformas especializadas para la selección de proteínas apicales y para la transducción de señales (105). Finalmente se ha visto, que la integrina $\alpha_v\beta_3$ y la proteína Hsc70 pueden estar asociadas en rafts (43, 44). Por otro lado, se ha reportado que estos rafts están involucrados en el proceso de entrada del virus SV40 y como sitio de ensamble para el virus HIV y para el virus del sarampión (74, 98, 113).

En nuestro laboratorio se ha propuesto que el receptor funcional de rotavirus es un complejo de varios componentes celulares, que incluyen gangliósidos, integrinas y probablemente otras proteínas como hsc70, todos ellos asociados en rafts y esta organización es necesaria para que los rotavirus infecten eficientemente a su célula huésped.

3) Desnudamiento de la partícula viral e inicio de la transcripción del genoma viral

Antes de que el genoma de un virus pueda ser replicado en su célula huésped, la partícula viral tiene que desnudarse (desencapsidarse), lo cuál involucra la pérdida de su envoltura lipídica ó proteica. Para que este proceso se lleve a cabo, la partícula viral debe ser modificada estructuralmente; los factores que han sido involucrados en estos cambios son: la unión con el receptor, la exposición a un pH ácido en la vesícula endocítica, las bajas concentraciones de calcio del ambiente intracelular, etc (42).

En cuanto a los rotavirus, se sabe que la activación de la transcriptasa viral con la subsecuente síntesis del ARNm, requiere que el virión pierda las proteínas de la capa externa (15). *In vitro*, el tratamiento de las partículas virales con agentes quelantes de calcio ocasiona la pérdida de las proteínas de la capa externa, generando partículas de doble capa (DLPs), las cuales son activas en transcripción. Sin embargo, *in vivo*, aún no se conoce que ocasiona el desnudamiento de la partícula viral. Se ha propuesto que pudiera ser la interacción con su receptor o receptores celulares lo que origine los cambios conformacionales que lleven al desnudamiento de la partícula (37) o también, que el bajo calcio intracelular ocasione el desnudamiento de la partícula viral (71), sin embargo, Cuadras y col (18) encontraron que el aumento intracelular de calcio no inhibe la síntesis de proteínas virales. Con estos antecedentes, es claro que aún no se conoce de manera directa cuál es el factor, o factores, que desencadenan el desnudamiento de los rotavirus durante la infección.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Entra la luz y asciendo torpemente de los sueños al ensueño compartido...
y vuelve también la cotidiana historia: mi voz, mi rostro, mi temor, mi suerte... .
José Luis Borges (Argentina)*

El calcio tiene un papel importante en muchos procesos celulares incluyendo algunos procesos patológicos, como las infecciones virales (40, 51, 99, 115). En el caso de las infecciones por rotavirus, se ha observado que el calcio juega un papel preponderante durante varias etapas de su ciclo replicativo, ya que éste se lleva a cabo en compartimentos celulares con diferentes concentraciones de este ion, las cuales son determinantes en el proceso de maduración del virión (99).

Cuando el virus ingresa a la célula, éste encuentra una concentración citoplásmica del ion Ca^{+2} hasta 10,000 veces menor que la del medio extracelular (1mM). Se ha sugerido que la baja concentración intracelular de calcio es la responsable del desnudamiento de la partícula viral, lo que resulta en la activación de la transcriptasa viral (71). Sin embargo, estos datos son controversiales, ya que en nuestro laboratorio hemos encontrado que al aumentar la concentración de calcio intracelular alrededor de 4 veces la concentración basal durante las primeras etapas de la infección, no se inhibe la infectividad de los rotavirus (18). Después de la síntesis del RNA y de las proteínas virales, el paso final en la morfogénesis del virus es a través de la gemación de la DLP hacia el lumen del RE, donde la concentración de Ca^{+2} es nuevamente del orden de mM; en esta etapa el virus adquiere las proteínas de la capa externa VP4 y VP7, madurando a su forma infecciosa (TLP) (29). Paralelamente, como resultado de la síntesis de proteínas virales, se afecta la homeostasis de Ca^{+2} en la célula huésped (21), ocasionando la lisis celular y la salida de los viriones recién formados al medio extracelular.

Las observaciones que sugieren que el calcio tiene un papel importante durante las diferentes etapas del ciclo viral, son las siguientes:

i) La partícula infecciosa es estabilizada por la presencia de calcio en el medio.

Se sabe que la infectividad viral depende de la presencia de la capa externa. Cuando se trata al virus *in vitro* con agentes quelantes de Ca^{+2} , se pierden las proteínas VP4 y VP7 con la subsecuente pérdida de la infectividad viral (15). Por otro lado, la estabilidad de la partícula infecciosa se mantiene en el tiempo, sólo sí el virus se preserva en buffers con calcio o estroncio a una concentración mínima de 1.5 mM (104). Recientemente, se reportó que la estabilidad de los trímeros de VP7 *in vitro* es dependiente de la presencia

de calcio (24). Y por estudios de cristalografía de la proteína VP6 (65) se ha encontrado que esta proteína también une calcio.

ii) La transcriptasa viral se activa cuando se pierden las proteínas de la capa externa VP4 y VP7.

La estabilidad de la partícula infecciosa depende de la concentración de calcio en el medio, ya que tratamientos del virus con agentes quelantes de este ion, como el EGTA, provocan que las proteínas de la capa externa (VP4 y VP7) se desprendan del virus, dando lugar a partículas con dos capas proteicas que no son infecciosas pero son activas en transcripción (15). Por otro lado, se ha reportado que *in vitro* la concentración mínima de Ca^{+2} necesaria para que las proteínas virales de la capa externa se desprendan es cepa dependiente y esta concentración varía entre 20 y 600 nM de calcio. La diferente sensibilidad a la concentración de Ca^{+2} segrega con el gene que codifica para VP7 (38). Sin embargo, estos datos no concuerdan con el hecho de que las diferentes cepas de rotavirus pueden ser propagadas en las células MA104 que tienen una concentración basal de calcio de 100-200 nM (18), lo que para algunas cepas representa una concentración de calcio superior a la requerida para su desnudamiento *in vitro*. Estos hallazgos indican que aún no se ha dilucidado claramente cual es la señal que dispara el desnudamiento de la partícula viral *in vivo*.

iii) La maduración del virus es inhibida por la disminución de la concentración de calcio en el medio de cultivo.

La formación de TLPs es dependiente de la concentración de Ca^{+2} en el medio de cultivo (103). Se ha observado que cuando los rotavirus son propagados en células con bajo contenido de Ca^{+2} en el medio celular, se produce menos progenie viral y en ausencia de este ión, las partículas virales que se recuperan son exclusivamente DLPs (102). Por otro lado, la disminución de la concentración de este ion en el RE por la acción de la taspigargina, un inhibidor de la ATPasa de Ca^{+2} del RE, inhibe la glicosilación de VP7 y NSP4, y también la maduración de la partícula viral (76, 91). Además, se ha demostrado que en ausencia de Ca^{+2} , VP7 es excluida del complejo heteroligomérico compuesto normalmente por NSP4, VP4 y VP7 que participa en la gemación de la DLP hacia el lumen del RE (110).

iv) El efecto citopático de rotavirus se ha asociado con un incremento de la concentración citoplásmica de calcio en la célula huésped.

El efecto citopático causado por rotavirus en la célula huésped parece estar mediado por incremento de la concentración de calcio intracelular, inducido por la síntesis de proteínas virales (83) y se ha observado que la proteína no estructural NSP4 causa un incremento del Ca^{+2} intracelular, vía la activación de la fosfolipasa C y la producción de 1,4,5- trifosfato de inositol en células de origen intestinal HT29 (21).

OBJETIVOS

*Defender la alegría como algo inevitable,
defenderla del mar y de las lágrimas tibias
de las buenas costumbres y de los apellidos
del azar y también, también de la alegría
Mario Benedetti (Uruguay)*

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel del calcio en las primeras interacciones de rotavirus con su célula huésped.

Objetivos específicos

1. Estudiar la influencia de la concentración de calcio extracelular en la infectividad de los rotavirus.
2. Estudiar que proceso de la interacción virus-célula es afectado por el aumento de la concentración de calcio.

MATERIALES Y METODOS

*Déjame acariciar tu piel como agua deslizándose entre mis manos
recostar el cuello en el vientre y revolcarnos
hasta oscurecer la noche... ..
Abelardo Sánchez León (Perú)*

4.1. Células y virus. Se utilizó la línea celular MA104 (proveniente de células epiteliales de riñón de mono). Las células se crecieron en el Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) (GibcoBRL), suplementado con 10% de suero bovino fetal, a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. El MEM utilizado para evaluar el efecto del calcio fué preparado sin calcio y fué suplementado con las concentraciones indicadas de CaCl₂ (Sigma Chemical Co).

Se utilizaron las siguientes cepas de rotavirus: DS-1, 69M, Wa, ST3, B223, NCDV, RF, UK, MDR-13, YM, H2, L338, SA11 4S, RRV, nar3, TY-1 y CH-2. También se utilizaron poliovirus tipo 3 (cepa León) y reovirus tipo 1. El origen de estas cepas se indica en la Tabla 2 del artículo. Todas las cepas de rotavirus fueron propagadas en las células MA104 (28), poliovirus y reovirus fueron propagados en células Hela, y en células L, respectivamente.

El rotavirus RRV se purificó en gradientes isopícnicos de CsCl₂, siguiendo el protocolo previamente descrito (125). El contenido de proteínas de las partículas virales se cuantificó mediante el ensayo de Bradford (Bio-rad).

4.2. Titulación del virus. Se realizaron diluciones de lisado viral o de virus purificado previamente activado con tripsina (10 µg/ml durante 30 minutos a 37°C) en MEM con una concentración de CaCl₂ de 2 mM o 10 mM. Posteriormente con estas diluciones de virus, se infectaron células MA104 confluentes, cultivadas en placas de cultivo de 96 pozos durante 1 h a 37°C. Luego de esta incubación, se retiró el exceso de virus, se lavaron las células dos veces con MEM y se dejó proseguir la infección por 14 h a 37°C en MEM sin suero. Las células se fijaron y se inmuno-tiñeron por un ensayo de inmunoperoxidasa, siguiendo el protocolo descrito por Arias y col. (2). El número de células infectadas se cuantificó empleando el sistema semiautomático Visiolab (45). La infectividad viral fué expresada como ffu (del inglés focus forming units) por mililitro.

4.3. Ensayos de infectividad. Monocapas confluentes de células MA104, crecidas en placas de 96 pozos, se infectaron durante 1 hora a 37°C, con una cantidad conocida de virus previamente activado con tripsina. Posteriormente se retiró el exceso de virus, las células se lavaron dos veces con medio de cultivo y se incubaron durante 14 horas a 37°C en MEM sin suero. Luego se continuó como se describe en el ensayo anterior.

Para los ensayos de infectividad en presencia de distintos iones divalentes, el MEM se suplementó con una concentración final de 10 mM de las siguientes sales: MgCl₂, SrCl₂, BaCl₂, ZnCl₂ y MnCl₂ (Sigma Chemical Co).

4.4. Tratamiento de las células.

a) Neuraminidasa. Monocapas confluentes de células MA104 en placas de 96 pozos se trataron antes de la infección con diferentes concentraciones de neuraminidasa de *A. ureafaciens* (Sigma Chemical Co), diluida en MEM, durante 1 hora a 37°C, como ha descrito Méndez y col (80). Después de esta incubación, las células se lavaron dos veces con medio de cultivo y posteriormente se infectaron con lisado activado de rotavirus en presencia 2 mM y 10 mM de calcio, y se continuó como está descrito en el ensayo de infectividad.

b) Drogas que aumentan la concentración intracelular de calcio. Monocapas confluentes de células MA104 en placas de 96 pozos se trataron antes de la infección con varias concentraciones de Ionomicina o Tapsigargina (Sigma Chemical Co) diluidas en MEM, durante 15 min a 37°C, y la concentración de estas drogas se mantuvo durante la hora de infección con rotavirus, según ha descrito Cuadras y col (18).

4.5. Ensayo de unión. Este ensayo se realizó sobre monocapas confluentes de células MA104 crecidas en placas de 48 pozos. Las células se incubaron con 1% BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se lavaron con MEM y se añadió virus RRV purificado (500 ng/pozo) suspendido en MEM 1% BSA conteniendo 2 mM ó 10 mM de calcio. El virus se adsorbió sobre las células durante 1 hora a 4°C, con agitación suave. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con medio de cultivo a 4°C para retirar el exceso de virus y finalmente, se añadieron 120 µl de MEM sin suero a cada pozo, las células se congelaron y descongelaron 2 veces para lisarlas. Las partículas virales unidas a

las células, presentes en los lisados resultantes, se cuantificaron por un ensayo de ELISA específico para rotavirus (125) y su título viral fué determinado por un ensayo de inmunoperoxidasa como se ha descrito previamente.

4.6. Mediciones de fluorescencia. Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro de luminiscencia, Modelo LS-50 (Perkin Elmer). Se colectaron los datos de un barrido de la emisión de fluorescencia entre 300 y 400 nm. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm, con un ancho de banda de 10 nm en ambos monocromadores (de excitación y de emisión). La fluorescencia intrínseca de los triptofanos de las partículas virales purificadas (10 µg/ml) suspendidas en solución fisiológica (130 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1 mM NaHCO₃, 0.5 mM NaHPO₄, 5 mM Hepes-Na, 5 mM glucosa, [pH 7.4]) (101), se midió a 25°C, en una cubeta de 1 cm de diámetro con agitación magnética suave. Los resultados que se presentan son el promedio de 3 mediciones de la intensidad de la fluorescencia en la misma muestra.

Los estudios de apagamiento de la fluorescencia con ioduro de potasio (KI), se realizaron en una suspensión de virus en solución fisiológica, conteniendo 2 mM ó 10 mM de CaCl₂, a la que se agregó una solución de 50 mM de KI por goteo, como ha sido descrito previamente (121). La longitud de onda de excitación fue 295 nm y se colectaron los datos de emisión de la fluorescencia a 328 nm. El grado de apagamiento de la fluorescencia se calculó según la ecuación modificada de Stern-Volmer (61, 63): $F_0/(F_0-F) = ((1/F_a) + (1/(F_a K[Q]))$; donde F_0 y F son la intensidad de la fluorescencia de la proteína en la longitud de onda apropiada, en presencia y en ausencia del agente que abate la fluorescencia (KI), respectivamente; F_a es la fracción de grupos fluorescentes accesibles a este agente; K es la constante de Stern-Volmer y Q es la concentración de KI.

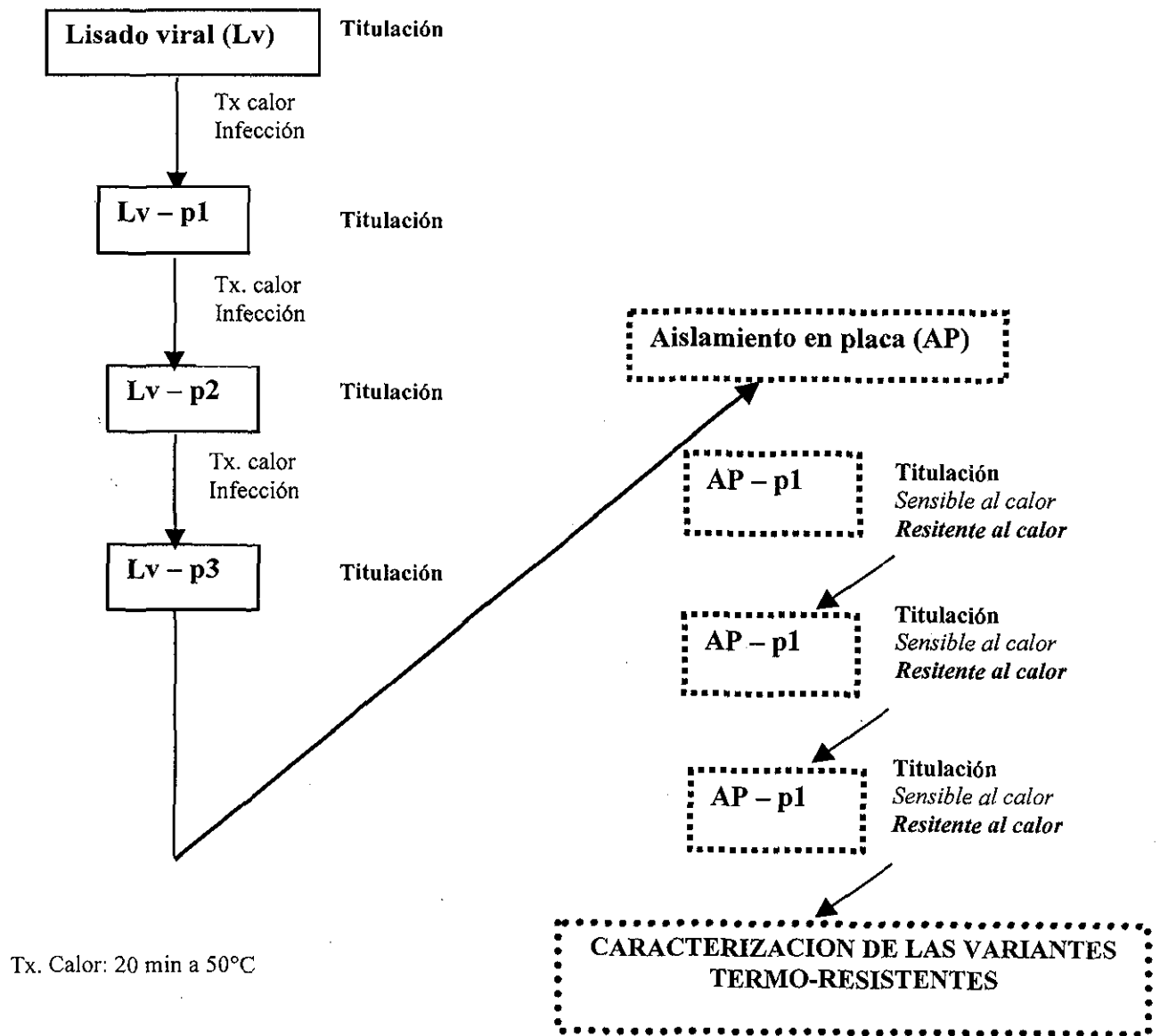
4.7. Tratamiento del virus con calor. Una cantidad conocida tanto del rotavirus de simio RRV como del rotavirus bovino RF diluida en MEM con 2mM y 10 mM CaCl₂, se distribuyó en alícuotas del mismo volumen. Estas alícuotas fueron expuestas durante diferentes tiempos a 50°C, al término del tiempo correspondiente a una alícuota determinada, ésta fué puesta en un recipiente con hielo hasta el momento de ser utilizada. Con estos virus se infectaron células MA104 confluentes crecidas en placas de cultivo de

96 pozos. La infección se realizó por 1 h a 37°C, luego se lavaron las células y se continuó como se describe en el ensayo de infectividad.

4.8. Selección de variantes de rotavirus RRV termo-resistentes. Una cantidad conocida de rotavirus RRV diluída en MEM fué expuesta por 20 minutos a 50°C, al cabo de este tiempo se pusieron sobre hielo. Posteriormente, se titularon los virus calentados y no calentados. Con el virus calentado se infectó una monocapa confluyente de células MA104 (0.5×10^4 células) (caja de 6 pozos); y se realizaron tres pases de infección con este lisado, manteniendo la presión de selección (es decir pre-tratamiento del virus a 50°C durante 20 min) hasta obtener un título viral menor de 10^4 ffu/ml. A partir de este virus, se realizaron 3 rondas de selección por aislamiento en placa manteniendo la presión de selección.

Para el ensayo de aislamiento en placa, se realizaron infecciones de células MA104 confluentes, crecidas en placas de cultivo de 6 pozos con lisado viral durante 1 h a 37°C. Luego se lavaron las células por dos veces, se añadió sobre ellas 3 ml de MEM-agarosa 0.6% a 37°C y la infección se dejó proseguir durante 3 días. Al cabo de este tiempo, se añadió 1 ml de MEM-0.33% rojo neutro, se cubrieron las placas con papel aluminio, se incubaron por 4 h a 37°C. Se retiró el medio y se picaron las placas. Las placas aisladas fueron resuspendidas en MEM. Para analizar el fenotipo de cada placa, estas fueron congeladas - descongeladas, luego se activó el lisado viral con tripsina y se separó en dos alícuotas. Una de las alícuotas se dejó a temperatura ambiente y la otra se expuso durante 20 min a 50°C. Luego, se infectó células MA104 crecidas en placas de 24 pozos con el virus no expuesto y con el virus expuesto a calor. Se tituló cada lisado viral como se ha descrito anteriormente. Con los virus resistentes a calor se realizaron las rondas de selección por el ensayo de aislamiento en placa, manteniendo la presión de selección (ver diagrama de flujo).

Diagrama de flujo: Selección de variantes de rotavirus termo-resistentes



RESULTADOS

*Un sauce de cristal, un chopo de agua
un alto surtidor que el viento arquea,
un arbol bien plantado y danzante,
un caminar de río que se curva,
avanza, retrocede, da un rodeo y llega siempre:... ..
Octavio Paz (Mexico)*

5.1. La infectividad de los rotavirus es dependiente de la concentración de calcio. Para evaluar el efecto del calcio sobre la infectividad de los rotavirus, se utilizó el virus RRV que es una cepa aislada del mono Rhesus, la cual ha sido ampliamente caracterizada bioquímica y molecularmente (Estes, 1996). El virus RRV se preincubó con diferentes concentraciones de CaCl_2 , partiendo de 1.8 mM que es la concentración de este ion en el medio de cultivo, hasta 14.4 mM que es la concentración de calcio que la célula pudo tolerar sin sufrir daño aparente (a concentraciones más altas de calcio la viabilidad celular medida por azul de tripano disminuye drásticamente). Con estos virus, se infectó una monocapa de células MA104 según se ha descrito en Material y Métodos (M y M). Se encontró que el incremento de la infectividad viral es dependiente del aumento de la concentración de calcio. Este incremento llegó a ser de alrededor de 4 veces sobre el control (infectividad del virus en 1.8 mM CaCl_2), cuando se utilizó 10 mM CaCl_2 (Fig. 1).

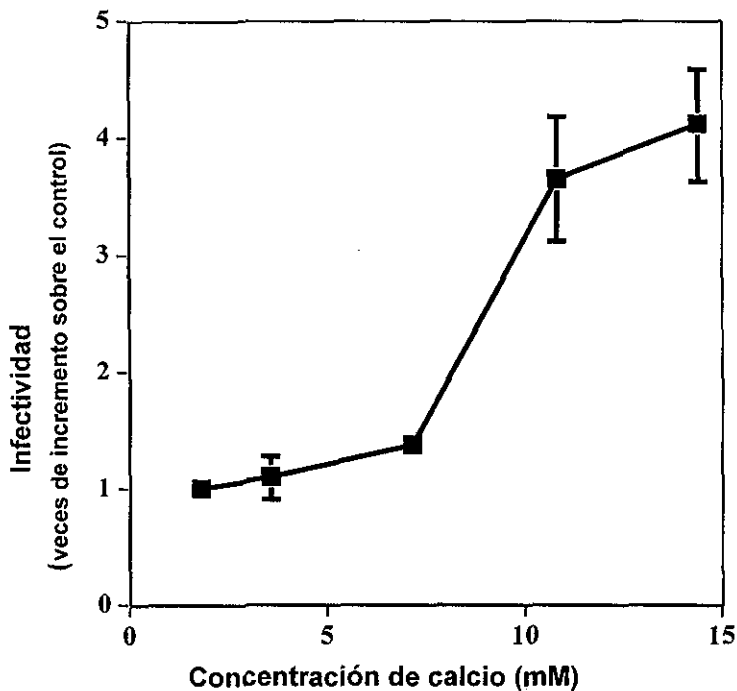


Figura 1. Efecto de la concentración de calcio sobre la infectividad del rotavirus RRV. Monocapas de células MA104 se infectaron por 1 hora a 37°C con rotavirus RRV en presencia de las concentraciones indicadas de calcio. El virus excedente se retiró, se añadió MEM sin suero con 1.8 mM de CaCl_2 y la infección se dejó proseguir por 14 h a 37°C; tiempo al que las células se fijaron y se inmunotifieron como está descrito en M y M. La infectividad viral se expresa como veces de incremento sobre el control (infectividad del virus en las diferentes concentraciones de calcio sobre la infectividad del virus en MEM con 1.8 mM de CaCl_2). Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes, con su respectiva desviación estándar (DS).

Basados en los resultados de este experimento, los siguientes ensayos se realizaron en presencia de 10 mM CaCl₂, utilizando 2 mM de CaCl₂ como la concentración control.

La siguiente pregunta que nos formulamos fue acerca de la especificidad de esta observación, tanto en lo que respecta al ion divalente como a la cepa viral. Para esto, se realizaron infecciones de una monocapa de células MA104 con el rotavirus RRV en presencia de distintos iones divalentes (Ca⁺², Ba⁺², Mg⁺², Mn⁺², Sr⁺² y Zn⁺²) a una concentración final de 10mM del divalente. Se encontró que el aumento de la concentración de los iones calcio o estroncio en el medio de cultivo originan un incremento de la infectividad viral mientras que los otros iones divalentes magnesio y bario no presentan este efecto (Tabla I). El manganeso y el zinc resultaron tóxicos para las células, por lo que no se determinó su efecto sobre la infectividad viral en dicha concentración. Los iones calcio y estroncio poseen un radio iónico muy semejante y se ha reportado que pueden compartir funciones estructurales similares en algunas proteínas (84, 120). Estos resultados indican que el efecto del calcio sobre la infectividad viral es un efecto específico de este ion (además del estroncio) y que no es un efecto sólo de carga ya que otros iones divalentes no lo presentan.

Tabla 1: Efecto de otros iones divalentes sobre la infectividad de rotavirus RRV.

DIVALENTE	INFECTIVIDAD veces de incremento sobre el control *
Calcio 2mM	1
Bario 10 mM	0.95 ± 0.04
Calcio 10 mM	5.65 ± 0.21
Estroncio 10 mM	3.7 ± 0.56
Magnesio 10 mM	0.85 ± 0.07

*expresada como título viral en 10 mM de cada divalente/ título viral en 2mM CaCl₂. Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes, con su DS.

Para estudiar si el efecto del calcio sobre la infectividad es una característica particular del rotavirus RRV o es un efecto más general sobre la infectividad de los rotavirus, se realizaron ensayos de infectividad con cepas de rotavirus aisladas de diferentes especies animales, en presencia de 2 mM o de 10 mM CaCl₂. Se observó que todas las cepas

analizadas presentan un incremento de su infectividad en 10 mM CaCl₂, y éste es independientemente del origen de la cepa (Tabla II).

Tabla II: Efecto del calcio sobre la infectividad de distintas cepas de rotavirus.

Virus	Origen	Título viral*		Infectividad [§]
		2 mM CaCl ₂	10 mM CaCl ₂	
DS-1 ^a	Hu	6.2x10 ⁴	3.5x10 ⁶	56.5 ± 19.0
ST3 ^b	Hu	2.1x10 ⁴	8.7x10 ⁵	41.3 ± 16.0
TY-1 ^a	Av	3.5x10 ⁵	6.6x10 ⁶	18.9 ± 5.0
CH-2 ^a	Av	5.2x10 ⁵	7.0x10 ⁶	13.5 ± 0.2
nar3 ^c	Si	6.7x10 ⁵	7.0x10 ⁶	10.4 ± 1.1
Wa ^d	Hu	3.9x10 ⁶	2.9x10 ⁷	7.4 ± 0.3
UK ^b	Bo	1.2x10 ⁶	8.5x10 ⁶	7.1 ± 0.2
L338 ^b	Eq	9.4x10 ⁶	5.8x10 ⁷	6.2 ± 3.1
RRV ^d	Si	6.4x10 ⁶	3.7x10 ⁷	5.8 ± 0.2
B223 ^a	Bo	5.7x10 ⁵	2.7x10 ⁶	4.8 ± 0.1
RF ^c	Bo	4.0x10 ⁶	1.8x10 ⁷	4.7 ± 0.4
YM ^c	Po	3.9x10 ⁶	1.7x10 ⁷	4.3 ± 0.5
H2 ^b	Eq	1.4x10 ⁶	5.6x10 ⁶	4.0 ± 1.7
69M ^f	Hu	5.8x10 ⁶	2.0x10 ⁷	3.4 ± 0.3
SA11 4S ^g	Si	4.3x10 ⁷	1.1x10 ⁸	2.5 ± 0.2
NCDV ^b	Bo	6.9x10 ⁷	1.6x10 ⁸	2.3 ± 0.6
Poliovirus ^h	Hu	4.0x10 ⁴	4.0x10 ⁴	1.0 ± 0.2
Reovirus ⁱ	Hu	2.7x10 ⁵	3.0x10 ⁵	1.1 ± 0.2

*Los resultados son el promedio de tres experimentos realizados de manera independiente. [§] expresada como veces de incremento sobre el control (título viral en 2mM CaCl₂). Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes, con su respectiva DS. ^a Y. Hoshino, National Institutes of Health, Bethesda, MD. USA; ^b D.R. Snodgrass, Morendun Research Institute, Edinburgh, U. K.; ^c This lab, IBT-UNAM. Mex; ^d H.B. Greenberg, Stanford University, Palo Alto, CA, USA; ^e J. Cohen, Institut National de la Recherche Agronomique, Cedex, France; ^f G.N. Woode, College of Veterinary Medicine. Texas A&M University. USA; ^g M.K. Estes, Baylor College of Medicine, Houston, Texas. USA. ^h R. M. del Angel, CINVESTAV-IPN, Mex. ⁱ C. Ramos, CISEI, Instituto Nacional de Salud Pública, Mex.

La magnitud del incremento en la infectividad fue variable; se observó incrementos de 2 veces (cepa NCDV) ó 50 veces (cepa DS-1) y no se encontró una relación entre la magnitud del incremento y la biología del virus. También se analizó el efecto del calcio en la infectividad de otros virus tales como poliovirus y reovirus, se encontró que la

infectividad de estos virus no se alteró por el aumento de la concentración de calcio. Estos resultados indican que el aumento de la concentración de calcio en el medio durante las primeras etapas de la infección viral, tiene un efecto general sobre la infectividad de los rotavirus y no de otros virus.

5.2. Efecto del calcio en las primeras interacciones de rotavirus con su célula huésped. Experimentalmente se pueden diferenciar los eventos de unión y penetración del virus a la célula. Se sabe que a 4°C los rotavirus se unen a la membrana celular pero no son capaces de ingresar al citoplasma, para que esto ocurra es necesario que las células se encuentren a 37°C. Para determinar que etapa durante las primeras interacciones del virus con la célula se favorece por el incremento de calcio en el medio, se realizó el siguiente experimento: el virus se adsorbió a las células en presencia de 2 mM ó de 10 mM calcio durante 30 minutos a 4°C, y posteriormente se cambió el medio a 10 mM ó a 2 mM calcio, respectivamente, y la temperatura se incrementó a 37°C para permitir la entrada del virus.

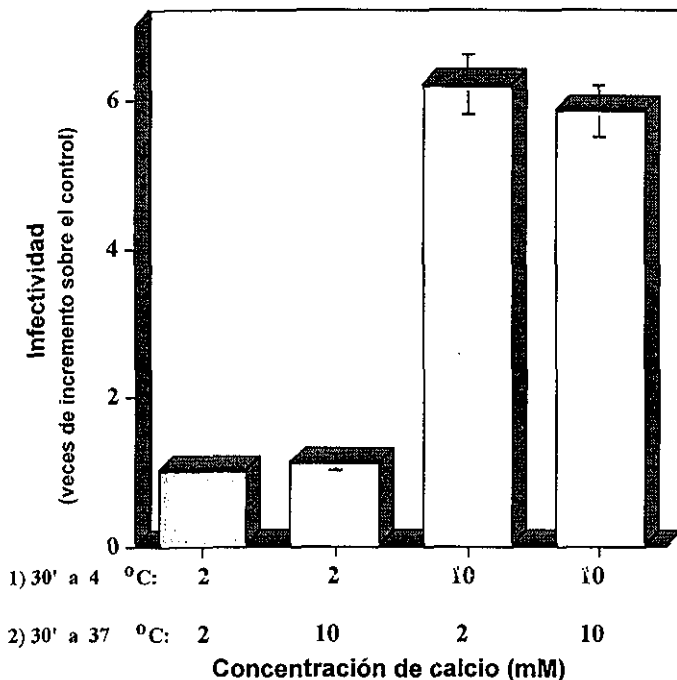


Figura 2. Efecto del calcio sobre las primeras interacciones del rotavirus RRV con su célula huésped. El virus RRV en presencia de 2 mM ó de 10 mM CaCl_2 , se adsorbió durante 30 min a 4°C sobre monocapas de células MA104, se retiró el exceso de virus y se añadió medio a 37°C conteniendo 2mM ó 10 mM CaCl_2 durante 30 min. Posteriormente se retiró este medio y la infección se dejó proseguir por 14 h a 37°C en MEM sin suero. Las células se procesaron como se indica en la figura 1. La infectividad viral se expresa como veces de incremento sobre el control (infectividad viral en 2 mM CaCl_2). Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes con su DS.

Se encontró un incremento de la infectividad solamente en las condiciones en las que los virus se unieron inicialmente a la célula en presencia de 10 mM calcio a 4°C (Fig.2). Cuando los virus se adsorbieron a la célula en presencia de 2mM calcio y posteriormente se aumentó la concentración a 10 mM calcio no se observó ningún incremento de la

infectividad viral. Estos resultados sugieren que el calcio podría favorecer la unión de un mayor número de partículas virales a la célula.

En vista de este resultado, se realizó un ensayo de unión para confirmar si efectivamente el calcio favorece la adsorción del virus a la célula. Para esto, el virus purificado se incubó con las células MA 104 en presencia de 2 ó 10 mM de calcio, durante 1 hora a 4°C, después de este tiempo, se lavaron las células dos veces con MEM para desechar el virus excedente. Luego, se añadió MEM a las células y éstas se congelaron y descongelaron por dos veces y este lisado viral se separó en dos alícuotas; en una de ellas se cuantificó las partículas virales que se unieron específicamente a las células mediante un ensayo de ELISA (Fig. 3A). Se encontró que la unión del virus en las dos condiciones de calcio que se probaron es similar, es decir, no se observó una diferencia significativa en la cantidad de virus unido a las células en 2 mM o en 10 mM CaCl_2 . Sin embargo, cuando en este mismo lisado, se cuantificó la infectividad del virus unido a la célula en 2 mM o en 10 mM CaCl_2 , se observó que los virus en presencia de 10 mM calcio incrementan su infectividad con respecto a los controles en 2 mM (Fig. 3B).

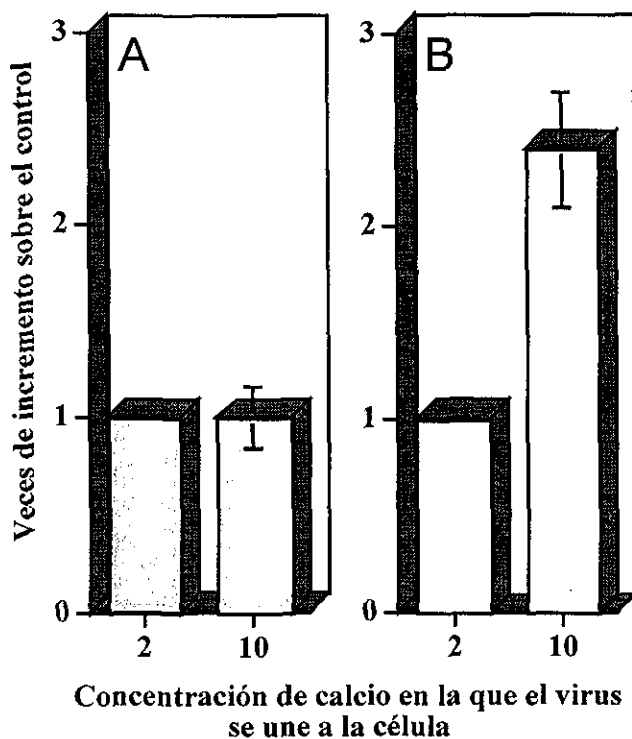


Figura 3. Efecto del calcio en la unión del rotavirus RRV a su célula huésped. Monocapas de células MA104 (cajas de 48 pozos) se incubaron durante 1 hora a 4°C con 500 ng de virus purificado en MEM con 2 mM ó 10 mM de CaCl_2 . Se desechó el virus no unido, se lavó las células con MEM y luego se lisaron. A) En el lisado viral se cuantificó el virus unido mediante ELISA. La unión del virus a la célula se expresa como valor relativo al valor de DO_{405} que se obtuvo en el ensayo de unión del virus en 2mM CaCl_2 . B) Monocapas de células MA104 se infectaron con una alícuota del lisado viral en MEM con 2 mM CaCl_2 , después de 1 h de adsorción a 37°C, se retiró el virus excedente y se prosiguió como está descrito en el ensayo de infectividad en M y M. Los resultados se expresan como veces de incremento sobre el control (infectividad del virus unido en 2 mM de CaCl_2). Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos realizados en forma independiente, con su DS.

Estos datos en conjunto, muestran que el efecto del calcio es antes que el virus ingrese a la célula y que el aumento de la concentración de calcio a 10 mM en el medio extracelular

no promueve que un mayor número de partículas virales se unan a la superficie celular. Sin embargo, aquellos virus que se unieron a la célula en alto calcio son más eficientes para los siguientes pasos de la infección.

5.3. El efecto del calcio es sobre la partícula viral. Para analizar si el efecto del calcio en la infectividad viral se debe a que este ión origina un cambio en la célula y esto promueve una mayor infección de los rotavirus, se realizaron infecciones de RRV en células MA104 que habían sido preincubadas en medio con 2 mM o con 10 mM CaCl_2 . Para esto, una monocapa confluyente de células MA104 se incubó con MEM conteniendo 2 mM y 10 mM de CaCl_2 , durante 1 hora a 37°C ; luego se retiró el medio, se infectó con lisado del virus RRV en 2 mM ó 10 mM CaCl_2 durante 30 min y se prosiguió la infección como esta descrito en M y M. Se encontró que hubo un aumento de la infectividad viral, cuando el virus se encontraba en presencia de 10 mM calcio (Fig. 4). Este aumento tan marcado no se observó cuando las células se preincubaron en 10 mM calcio y luego se infectaron con virus que estaba en 2 mM calcio.

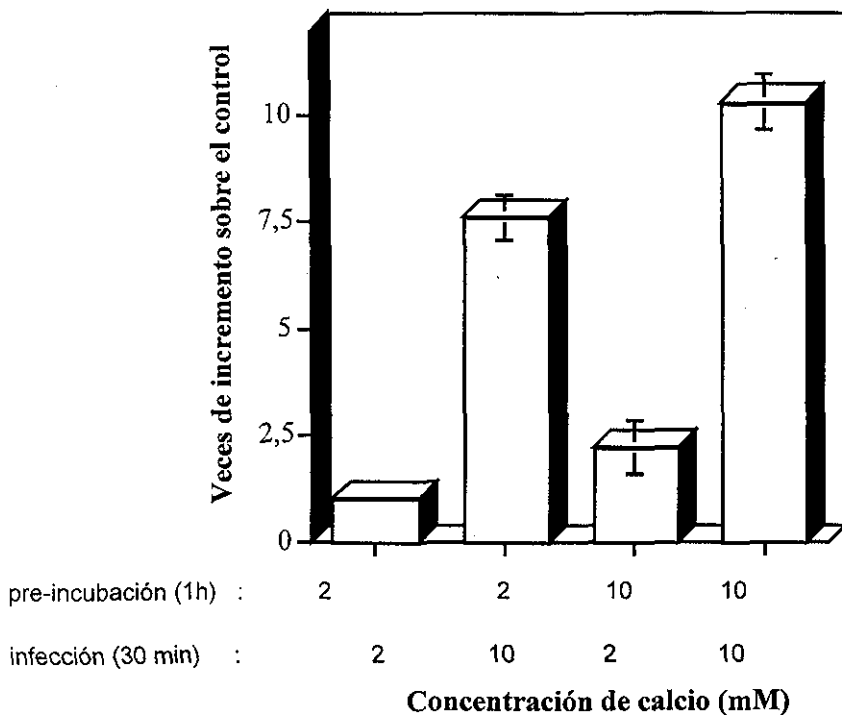


Figura 4. Infectividad del rotavirus RRV en células preincubadas con calcio. Una monocapa confluyente de células MA104 se preincubó en MEM con 2 mM ó 10 mM CaCl_2 , a 37°C durante 1 h. Posteriormente se retiró este medio y las células se infectaron con el virus RRV en 2 mM ó 10 mM CaCl_2 durante 30 min. El virus excedente se retiró, se añadió MEM y la infección se dejó proseguir por 14 h a 37°C , tiempo al que las células se fijaron y se inmunotifieron como está descrito en M y M. Los resultados se expresan como veces de incremento sobre el control (infectividad del virus en 2 mM de CaCl_2). Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes, con su DS.

Por otro lado, para evaluar la posibilidad de que al aumentar la concentración de calcio extracelular, se induzca un aumento de la concentración intracelular de calcio y éste sea el responsable del incremento en la infectividad viral, se realizaron ensayos de infectividad en presencia de drogas que aumentan la concentración de calcio intracelular. Se utilizó ionomicina, que es un ionóforo de calcio, y tapsigargina, que es un inhibidor de la ATPasa de Ca^{+2} del RE. Para esto, las células se preincubaron por 15 min con diferentes concentraciones de cada droga, y posteriormente se infectaron con RRV. La droga se mantuvo durante la hora de infección, posteriormente se lavaron las células y la infección se dejó proseguir por 14 h (18). La Tabla III muestra los resultados de estos experimentos, que indican que el aumento de la concentración intracelular de calcio durante los primeros eventos de la infección, no tiene efecto sobre la infectividad viral.

Tabla III. Efecto de ionomicina y tapsigargina sobre la infectividad del virus RRV

Tratamiento	Infectividad*
Tapsigargina	
1 μM	0.89 \pm 0.09
2 μM	1.02 \pm 0.12
4 μM	0.87 \pm 0.03
Ionomicina	
2 μM	0.85 \pm 0.06
4 μM	0.78 \pm 0.06
8 μM	0.85 \pm 0.15

Expresada como número de veces sobre el control (título viral de RRV en células no tratadas). Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes, con su DS.

Los datos anteriores sugieren que el efecto del calcio es sobre la partícula viral, para comprobar esta hipótesis se evaluó la reversibilidad del efecto del calcio sobre la infectividad viral. Para esto, un stock de lisado de virus RRV en MEM con 2 mM y 10 mM CaCl_2 , se mantuvo a 4°C por 30 min, luego se cambió la concentración de calcio en el medio a 10 y 2 mM CaCl_2 respectivamente y se determinó el título viral en diferentes tiempos, después del cambio en la concentración de calcio (Fig. 5A). Se encontró que cuando se aumenta la concentración de calcio de 2 a 10mM en el medio, la infectividad viral cambia rápidamente (1 min), el título viral se incrementa unas 4 veces sobre el control, virus que permaneció en 2 mM CaCl_2 . En contraste, cuando el virus resuspendido

en 10 mM CaCl₂ fué diluido hasta una concentración de 2 mM. Se encontró, que sólo después de 90 min de realizado el cambio en la concentración de calcio, el título viral disminuye a los valores del control. En el segundo experimento (Fig. 5B), el cambio en la concentración de calcio en el medio, se efectuó en virus unidos a la célula. Inicialmente se adsorbió lisado viral sobre una monocapa de células MA104 en 2 y 10 mM CaCl₂ a 4°C durante 30 min, luego se desechó el virus no unido, se lavaron las células y se resuspendieron en MEM con 10 y 2 mM CaCl₂ respectivamente, por diferentes tiempos a 4°C, posteriormente el medio fué remplazado por MEM con 2 mM calcio y la infección se dejó proseguir por 14 h a 37°C. Se determinó el título viral en cada muestra, y a diferencia del experimento anterior, se encontró que el título del virus no se modificó después del cambio en la concentración de calcio.

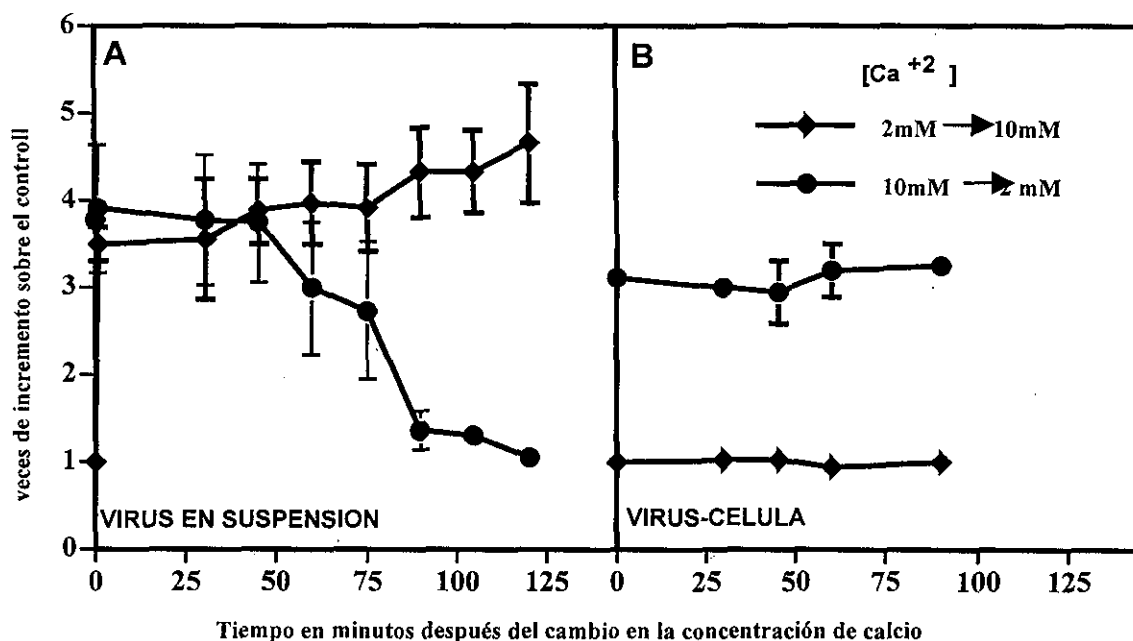


Figura 5. Reversibilidad del efecto del calcio sobre la infectividad de RRV. A) Un stock de RRV en 2 y 10 mM CaCl₂ se mantuvo a 4°C durante 30 min, luego se cambió la concentración de calcio en el medio a 10 mM y 2 mM respectivamente, durante distintos tiempos (a 4°C) y se tituló las muestras como se describe en M y M. B) Sobre una monocapa de células MA104 se adsorbió virus RRV en 2mM y 10 mM CaCl₂ a 4°C durante 30 min, posteriormente se cambió la concentración del medio a 10 mM y 2 mM CaCl₂ respectivamente y se mantuvo la infección a 4° C por distintos tiempos. Luego, se cambió el medio a MEM con 2 mM CaCl₂. La infección se dejó proseguir por 14 h a 37 CaCl₂. El resultado se expresa como veces de incremento sobre el control (virus que permaneció en 2mM CaCl₂).

Este resultado nos indica, que posterior a la unión del virus a la membrana celular, el aumento o disminución en la concentración de calcio no afecta su interacción con la célula. Los datos anteriores, en conjunto nos indican que el efecto del calcio es sobre la partícula viral.

5. 4. Efecto del calcio en la infectividad de rotavirus, en células tratadas con neuraminidasa. Muchos de los rotavirus aislados de especies animales son dependientes de la presencia de ácidos siálicos (AS) en la superficie celular para unirse y posteriormente ingresar a su célula huésped. Debido a esta característica, el tratamiento de las células con enzimas que remueven los AS (neuraminidasas) reduce drásticamente la unión de las partículas virales a la célula, con la consecuente reducción de la infectividad del virus. Se ha sugerido que el receptor para los rotavirus de origen animal es un compuesto que contiene AS (80). Sin embargo, los rotavirus aislados de humanos se unen a las células permisivas a través de un receptor que no contiene AS (ya que es resistente al tratamiento con neuraminidasa) y del cual hasta el momento no hay ninguna información.

El rotavirus de simio RRV requiere de la presencia de AS sobre la superficie de la célula para unirse e infectarla (80), y en consecuencia, el tratamiento de las células con neuraminidasa reduce la infección de este virus. Para estudiar, si el aumento de la concentración de calcio en el medio modifica las interacciones iniciales del virus RRV con la superficie de la célula, se realizaron ensayos de infectividad en presencia de 2 mM o de 10 mM de CaCl_2 , sobre células MA104 que fueron previamente tratadas con concentraciones crecientes de neuraminidasa. En este experimento se incluyó la cepa de rotavirus nar3, que es una mutante aislada a partir del rotavirus de simio RRV que ya no depende de la presencia de AS sobre la superficie de la células para infectarlas, y sí presenta un aumento de la ifectividad en 10 mM calcio. En la figura 6 se muestran los resultados de este experimento; cuando se midió la infectividad del virus RRV en 2 mM de calcio, se observó que su infectividad disminuye hasta en un 75% cuando las células se trataron con 20 mU/ml de neuraminidasa, como ya había sido reportado (80). Sin embargo, cuando este ensayo se realizó en presencia de 10 mM de calcio, se encontró una menor dependencia del rotavirus RRV por el AS, ya que a la misma concentración de neuraminidasa (20 mU/ml) la infectividad de RRV sólo se redujo un 15%. La infectividad

del virus mutante nar3, que se incluyó como control en este experimento, permaneció constante en ambas concentraciones de calcio. Estos resultados sugieren que el calcio facilita una interacción del virus con la superficie de la célula que es independiente de la presencia de AS, posiblemente a través de inducir un cambio conformacional en la partícula viral.

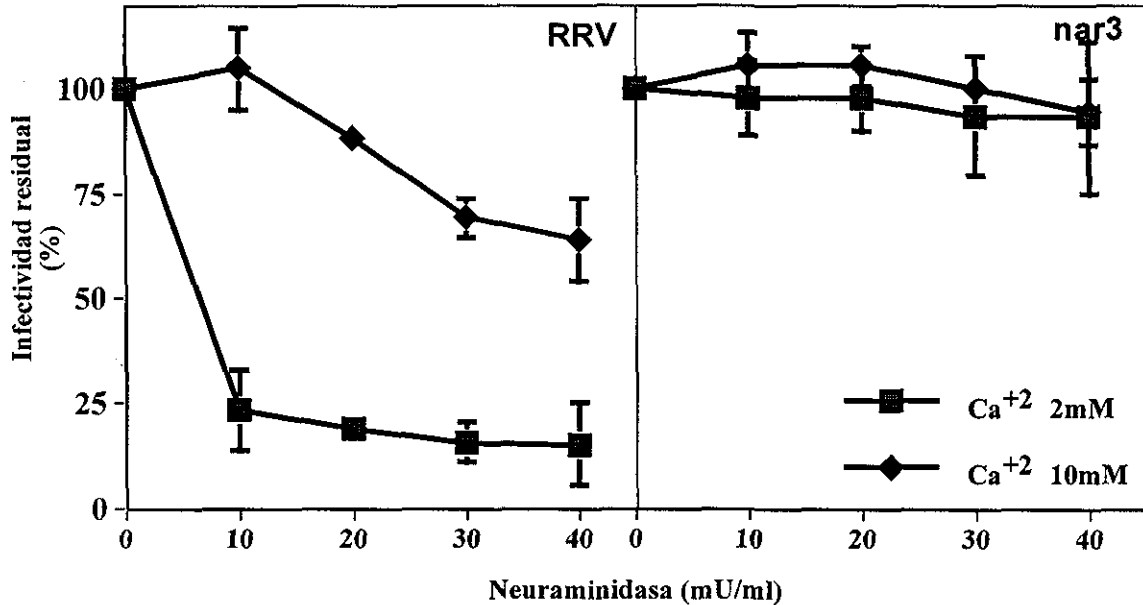


Figura 6.- Efecto del calcio en la infectividad de rotavirus en células tratadas con neuraminidasa. Monocapas confluentes de células MA104 se trataron con diferentes concentraciones de neuraminidasa (según se indica en la figura) por 1 hora a 37°C. Las células así tratadas se infectaron con los rotavirus RRV y nar3 en presencia de 2 mM ó 10 mM CaCl₂ y el ensayo de infectividad se llevo a cabo como está descrito en Material y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de la infectividad en cada condición con respecto a la infectividad del virus en células no tratadas con neuraminidasa. Los datos mostrados representan el promedio de 3 experimentos independientes con su respectiva DS.

5.5. Evaluación del cambio conformacional de la partícula viral. Basados en los resultados anteriores, formulamos la hipótesis de que el aumento de la concentración de calcio en el medio promueve un cambio conformacional en la partícula viral. Para analizar este cambio utilizamos: métodos indirectos, como la exposición de las partículas al calor y métodos directos como la medición de la fluorescencia intrínseca de la partícula viral.

Se analizó el efecto de la temperatura sobre la infectividad de los rotavirus en 2 mM y 10 mM CaCl₂. Para ello, se incubó el virus RRV y RF en MEM con las dos concentraciones de calcio a 50°C por diferentes períodos de tiempo. Posteriormente, se

realizó un ensayo de infectividad con estos virus. Se encontró que la infectividad de aquellos virus que estuvieron sometidos al calor en 10 mM CaCl_2 se vio menos afectada respecto a los mismos virus que fueron sometidos al calor en 2 mM CaCl_2 (Fig. 7). Por ejemplo: la infectividad del rotavirus RRV en 2 mM calcio disminuyó en un 70% a los 5 min del tratamiento con calor, mientras que la infectividad del mismo virus en 10 mM calcio sólo disminuyó en un 30%. Un efecto similar se observó para el virus bovino RF, cuya infectividad disminuyó en un 50% en 2 mM calcio, a los 5 min de tratamiento, pero en 10 mM calcio solo se observó una disminución de la infectividad del 20%. Estos resultados nos indican que los virus en 10 mM CaCl_2 son más resistentes al efecto de la temperatura, lo cuál sugiere, en concordancia con nuestras observaciones previas, que el aumento de calcio puede originar un cambio en la estructura del virus y que probablemente este cambio le puede conferir a la partícula viral una mayor estabilidad al calor.

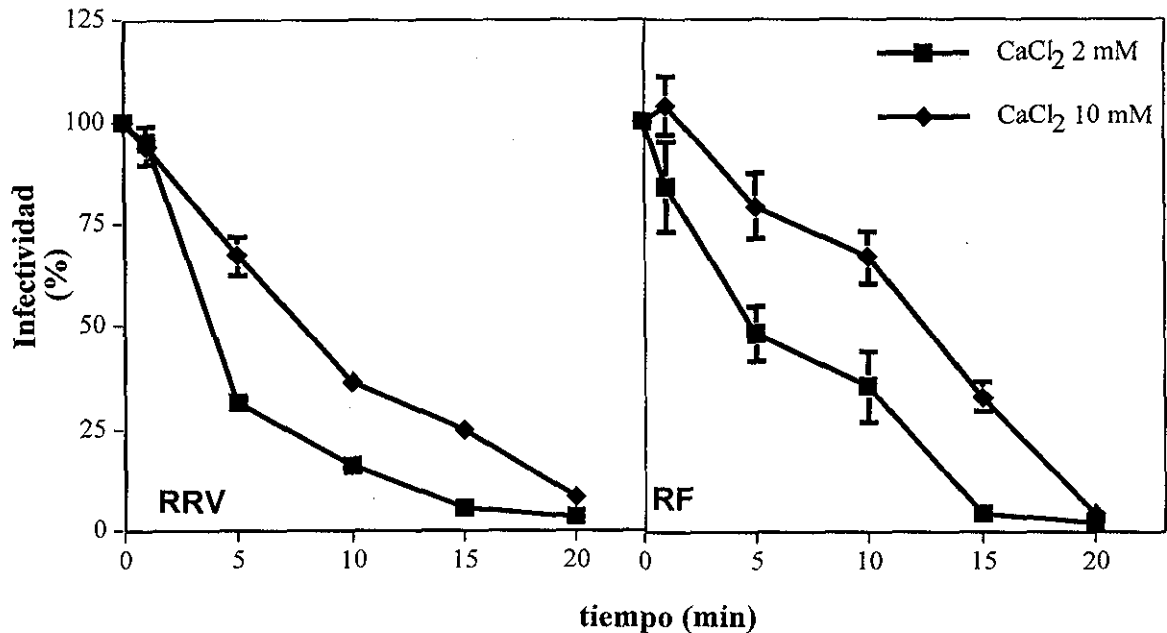


Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la infectividad de rotavirus en calcio 2 y 10 mM. Los virus RRV y RF en medio con 2 ó con 10 mM CaCl_2 , fueron incubados a 50°C por diferentes períodos de tiempo (según se indica en la figura). Al cumplirse el tiempo correspondiente cada muestra se guardó a 4°C. Posteriormente, monocapas confluentes de células MA104 fueron infectadas con estos virus, como está descrito en M y M. La infectividad viral se expresa como el porcentaje de infectividad respecto al control (título del virus no tratado). Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes, con su respectiva DS.

La espectroscopia de fluorescencia es una técnica utilizada para evaluar cambios en la estructura terciaria o secundaria de las proteínas, basada en la fluorescencia intrínseca de

sus residuos aromáticos. Las proteínas contienen tres aminoácidos aromáticos los cuáles contribuyen a su fluorescencia en el ultravioleta: tirosina (tyr), triptofano (trp) y fenilalanina (phe).

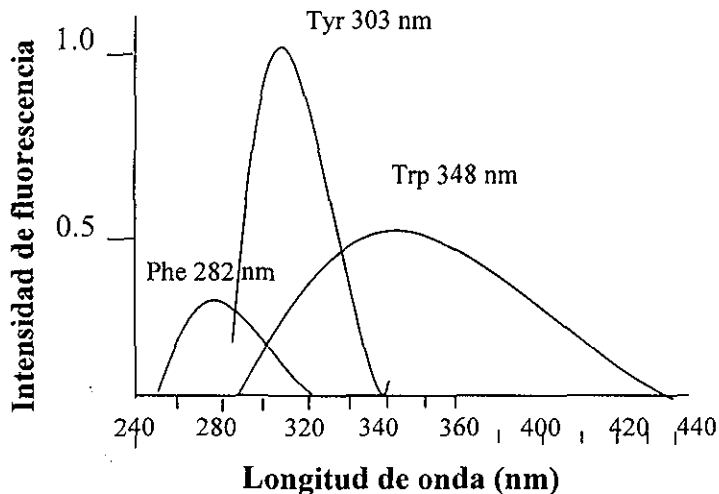


Figura 8. Espectro de emisión de los aminoácidos aromáticos. Se muestran los espectros de emisión de los aminoácidos aromáticos en agua. (publicado por Lakowicz, 1986).

Las proteínas generalmente exhiben una fluorescencia intensa entre 300-350 nm, después de una excitación a 280 nm. La fluorescencia de proteínas es usualmente dominada por los residuos de tirosina y triptofano. Fenilalanina exhibe una fluorescencia máxima a 282 nm (cuando está incorporada en una proteína, a 283-295 nm), tirosina a 303 nm y triptofano a 348 nm (cuando está incorporado en una proteína, a 305-350 nm). La eficiencia cuántica de estos residuos es 0.04, 0.1 y 0.2 respectivamente (106). El triptofano es el fluoróforo natural más eficiente en las proteínas, la tirosina es altamente fluorescente en solución pero su fluorescencia decae cuando está incorporado en una proteína. El espectro de absorción de los triptofanos presenta dos picos de absorción característicos, el primero se sobrelapa con el pico de absorción de las tirosinas a 280 nm y el segundo es único y se presenta a 295 nm. Para evaluar únicamente la fluorescencia de los triptofanos se excita la molécula en estudio a 295 nm.

Con el objetivo de determinar si el calcio es capaz de inducir cambios conformacionales en la partícula viral, se hicieron mediciones de la fluorescencia intrínseca de los triptofanos accesibles en las partículas virales completas del rotavirus RRV (TLPs) y de las partículas carentes de las proteínas de la capa externa VP4 y VP7 (DLPs) en presencia de 2 mM o de 10 mM CaCl_2 . La longitud de onda de excitación fue 295 nm. Se

observó que al aumentar la concentración de calcio en el medio a 10 mM se produjo un cambio en el espectro de emisión de las TLPs. Este no fue el caso para el espectro de emisión de las DLPs, cuya intensidad de fluorescencia permaneció constante en ambas concentraciones de calcio (Figura 9 A-B). Se realizó el espectro de emisión de las TLPs en presencia de 10 mM $MgCl_2$ y no se encontró cambio en la intensidad de fluorescencia respecto al control en 2 mM $CaCl_2$ (Fig. 9C), dato que correlaciona con la observación de que este ion, no tiene un efecto sobre la infectividad viral. Como controles de este ensayo se midieron los espectros de emisión de una solución de triptofanos en 2 mM y en 10 mM $CaCl_2$, en los que no se observó un cambio en la intensidad de la fluorescencia por el aumento de calcio en el medio (Fig. 9D). El espectro de emisión de las partículas virales tiene un pico de intensidad máxima a 328 nm, en comparación el espectro de emisión de los triptofanos libres a 360 nm (Fig. 9). Debido a que la emisión de los triptofanos es muy sensible a la polaridad del ambiente, este corrimiento, hacia longitudes de onda más cortas, indica que una proporción de los triptofanos se encuentra en el interior hidrofóbico de la proteína, lo cuál es evidente tanto en las TLPs como en las DLPs de rotavirus.

Estos datos nos indican que el aumento de calcio en el medio induce un cambio conformacional en la partícula de rotavirus, y este cambio se evidenció por un aumento en la intensidad de fluorescencia. Este efecto del calcio en la estructura de la partícula viral, es específico de las TLPs ya que la emisión de los triptofanos libres no es alterada por el aumento en la concentración de calcio. También, estos datos sugieren que el cambio conformacional es específico de las proteínas de la capa externa VP4 y VP7, ya que las DLPs (partículas sin las proteínas de la capa externa) no lo presentan.

Dado que el rotavirus RRV presenta un cambio en su espectro de emisión en 10 mM de calcio, quisimos evaluar también los espectros de emisión de las TLPs de los rotavirus nar3 y Wa (Figura 10), cabe mencionar que en su proceso de unión a la célula estos virus no requieren la presencia de ácido siálico en la membrana celular, en contraste con el rotavirus RRV. Se encontró que estos virus en 10 mM de calcio, también presentan un aumento de la intensidad de fluorescencia en su pico máximo de emisión.

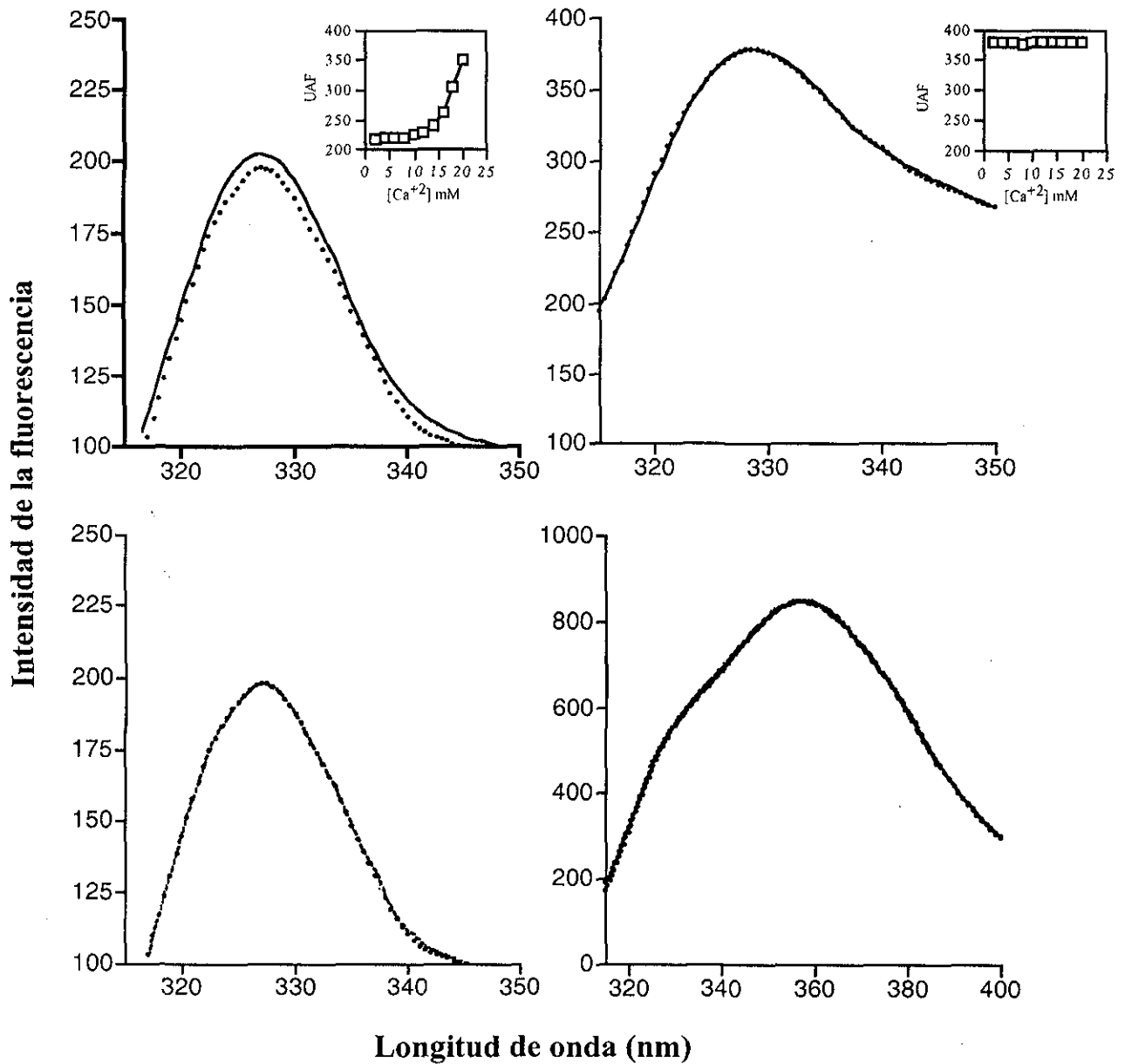


Figura 9. Espectros de emisión de la fluorescencia intrínseca de triptofanos. Se utilizó 10 µg/ml de las partículas purificadas de rotavirus RRV y 10 ng/ml de triptofanos, en solución fisiológica y se midió su espectro de emisión en 2 mM y 10 mM del divalente, como se describe en M y M. Se muestran los espectros de emisión en 2 mM CaCl₂ (puntos), después de la adición de calcio a una concentración final de 10 mM (línea continua) y a 10 mM Mg Cl₂ (línea punteada). A) TLPs, B) DLPs, C) TLPs en 2 mM CaCl₂ y 10 mM MgCl₂ y D) Triptofanos libres. Las intensidades de fluorescencia que se muestran son el promedio de tres mediciones. Las repeticiones de los espectros de emisión mostraron siempre el mismo patrón de cambio. La longitud de onda de excitación fue 295 nm.

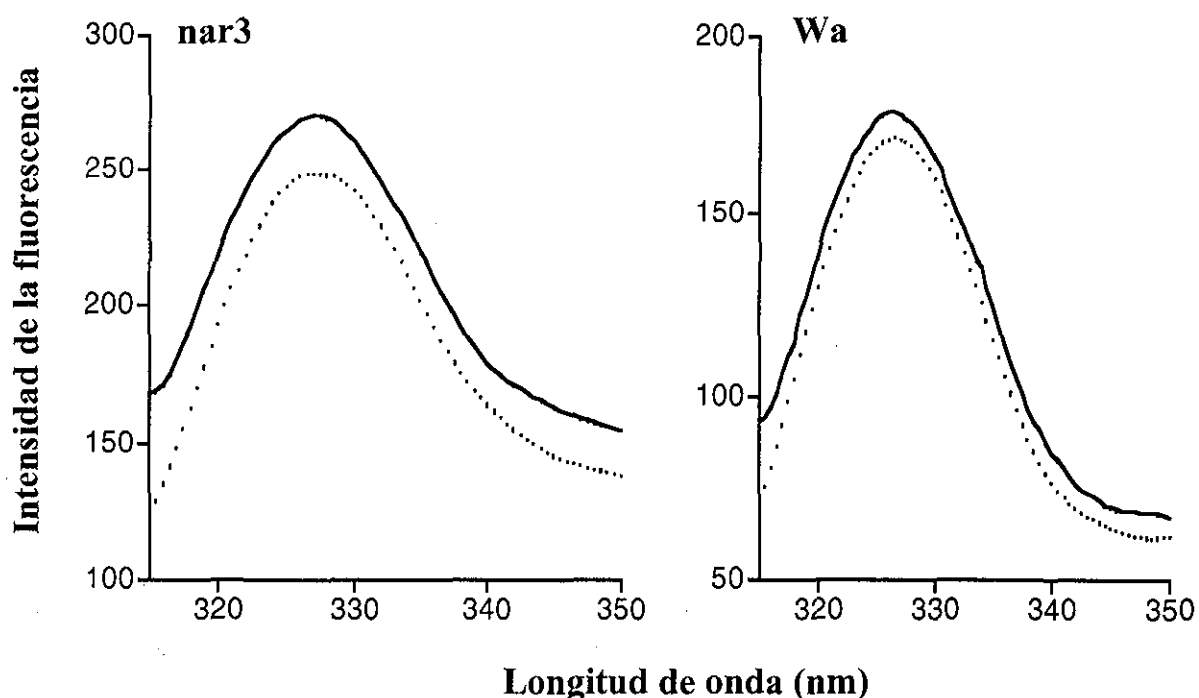


Figura 10. Espectros de emisión de los rotavirus nar3 y Wa. Se muestran los espectros de emisión de triptofanos de las partículas virales completas (TLPs) de los rotavirus nar3 y Wa en 2 mM CaCl_2 (línea punteada) y después de la adición de CaCl_2 a una concentración final de 10 mM (línea continua). La longitud de onda de excitación fué 295 nm. Las intensidades de fluorescencia que se muestran son el promedio de 3 mediciones. Las repeticiones de los espectros de emisión mostraron siempre el mismo patrón de cambio.

Para caracterizar más detalladamente la exposición de residuos de triptofano en la partícula viral, se realizaron estudios de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de las TLPs de rotavirus con acrilamida y con yoduro. Este tipo de ensayo permite la cuantificación de los residuos de triptofanos expuestos en la superficie de una proteína o en este caso en la partícula viral

La acrilamida es capaz de difundir tanto en ambientes hidrofílicos e hidrofóbicos. Con acrilamida si bien se observa un cambio en la intensidad de fluorescencia, al procesar los datos en la ecuación de Stern-volmer no se observó una diferencia en la exposición de triptofanos en calcio 10 mM respecto a calcio 2 mM, lo que puede indicar que la acrilamida esta ingresando al interior de la partícula (datos no mostrados). Sin embargo, con yoduro sí se observó una diferente exposición de triptofanos en la partícula viral. Los espectros de emisión de las TLPs de los rotavirus RRV y nar3 en 2mM y 10 mM CaCl_2 a diferentes concentraciones de yoduro, fueron analizados mediante la ecuación de Stern-Volmer para el

apagamiento colisional de la fluorescencia (Fig. 11). La pendiente de la línea representa la proporción de triptofanos expuestos en la partícula viral. Se encontró que para el rotavirus RRV la diferencia de triptofanos expuestos en las dos condiciones de calcio es de un 10 % (35.5% \pm 2.18 en 2 mM CaCl₂ y 45.7% \pm 4.21 en 10 mM CaCl₂) y para el rotavirus nar3 la diferencia de triptofanos expuestos en las dos condiciones de calcio es de un 18% (22.4% \pm 0.96 en 2 mM CaCl₂ y 39.88% \pm 2.31 en 10 mM CaCl₂). Este resultado confirma que el aumento de la concentración de calcio en el medio, induce un cambio conformacional en la partícula viral, el cuál se evidenció por una mayor exposición de residuos de triptofano al solvente.

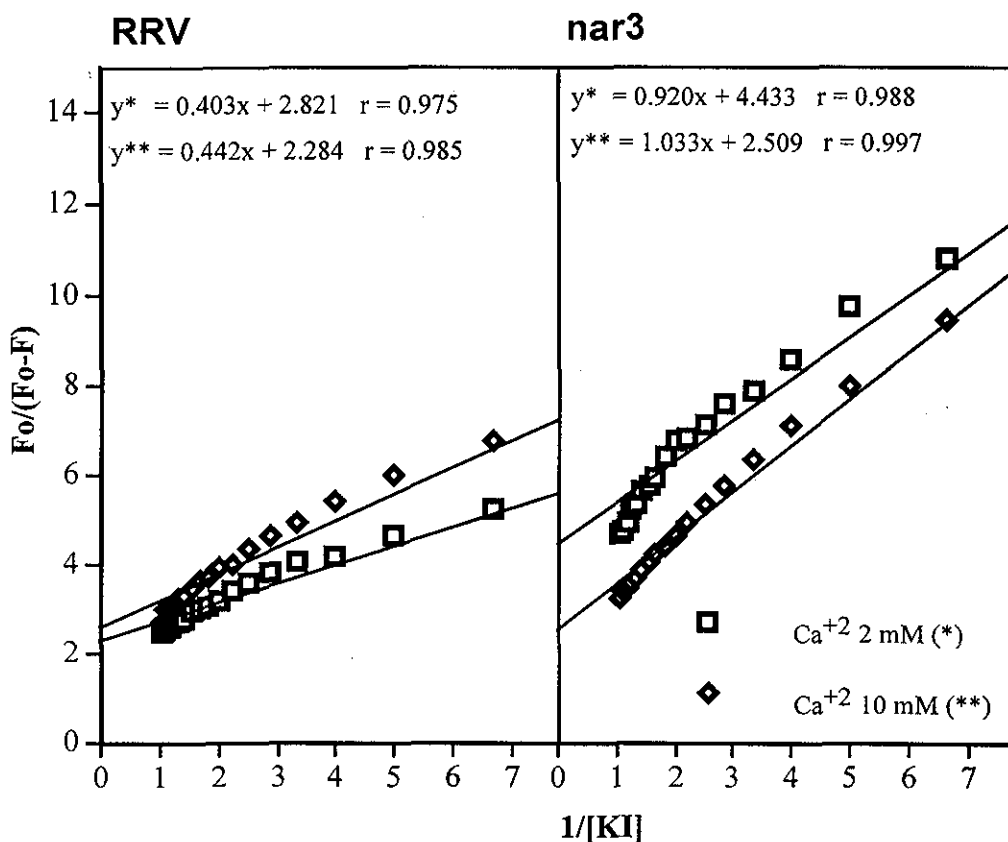


Figura 11. Apagamiento de la fluorescencia de las TLPs de RRV y nar3 por yodo. La intensidad de fluorescencia en ausencia y presencia de KI fué utilizada para construir una gráfica de apagamiento mediante la ecuación de Stern-Volmer : $F_0/(F_0-F) = ((1/F_a) + (1/(F_a K[Q]))$; donde F_0 y F son la intensidad de la fluorescencia de la partícula a 328 nm, en presencia y en ausencia de yodo, respectivamente; F_a es la fracción de grupos fluorescentes accesibles a este agente; K es la constante de Stern-Volmer y Q es la concentración de KI. Cada condición de calcio tiene su respectiva regresión lineal. Este experimento se realizó al menos tres veces en forma independiente

5.6. Aislamiento de variantes de RRV termo-resistentes. Dado que los rotavirus en 10 mM CaCl₂, son más resistentes al efecto del calor, nos propusimos aislar variantes de RRV termo-resistentes, teniendo como hipótesis que los rotavirus resistentes al calor, posiblemente pudiesen presentar en su estructura cambios similares a los cambios que origina el aumento de la concentración de calcio en la estructura de la partícula viral.

Para este aislamiento, se hicieron 3 pases del virus que fué calentado 20 min a 50°C antes de cada infección. Con el lisado resultante de estos tres pases se hizo un ensayo en placa para aislar clonas provenientes de la población viral. En la primera ronda de selección por aislamiento en placa, se aislaron 7 placas virales que presentaron resistencia a la temperatura. En la segunda ronda de selección usando la misma metodología, se aislaron 17 placas virales con resistencia a la temperatura, las cuales provienen de tres placas virales de la primera selección. Después de tres rondas de aislamiento en placa manteniendo la presión de selección, se escogieron 12 placas virales, las cuales presentaron mayor resistencia a la temperatura. Al evaluar el fenotipo de estas placas respecto a calcio, se observó que estas presentaban distinto comportamiento, unas no aumentaban su infectividad en calcio 10 mM y otras aumentaban su infectividad pero menos que la cepa silvestre (Fig. 12). Actualmente, en nuestro laboratorio se están caracterizando fenotípica y genéticamente estas variantes termoresistente.

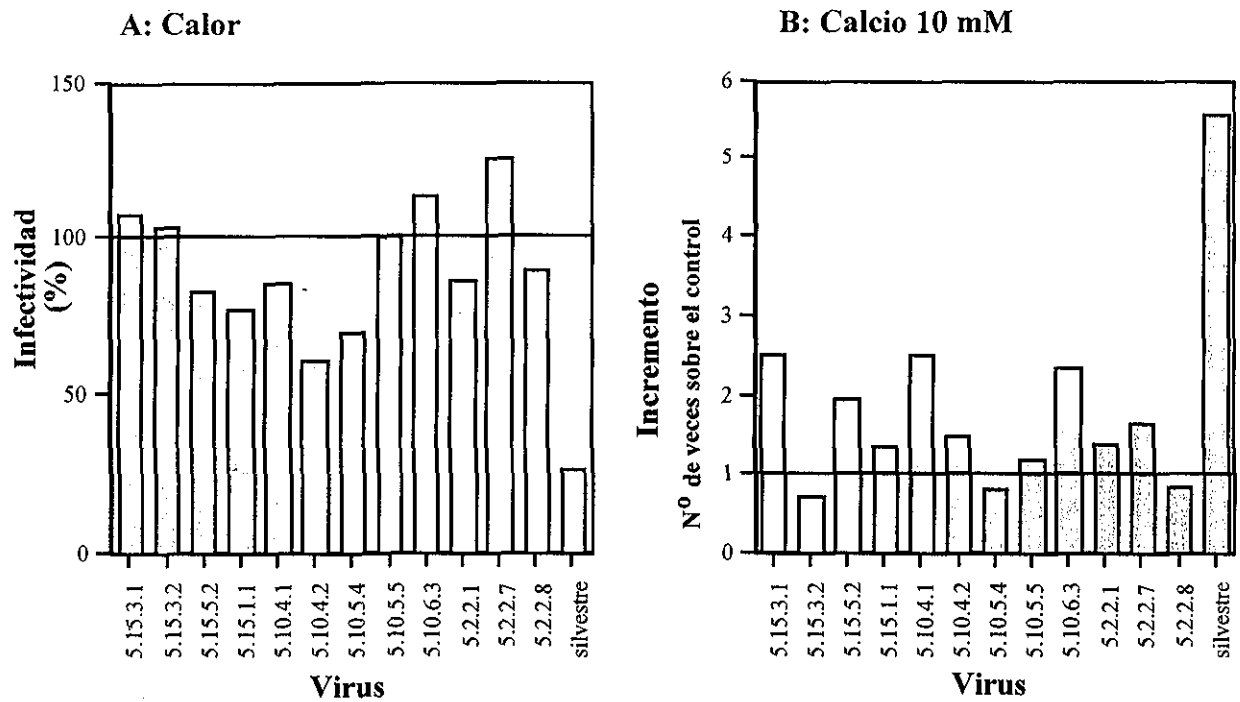


Figura 12. Evaluación del fenotipo de las variantes de rotavirus RRV resistentes a la temperatura. **A:** Las variantes termoresistentes aisladas en este trabajo y el virus silvestre se trataron durante 20 min a 50°C, y se tituló su infectividad en una monocapa de células MA104 (placas de 96 pozos). La infectividad viral se expresa como porcentaje de infectividad respecto al control (título del virus respectivo no tratado con calor). **B:** Una monocapa confluyente de células MA104 (placas de 96 pozos) se infectó con las variantes termo-resistente y con el virus silvestre en MEM con 2 mM y 10 mM CaCl₂, durante 1 hora a 37°C, luego se continuó la infección según esta descrito en el ensayo de infectividad en Material y Métodos. La infectividad viral se expresa como el número de veces de incremento de la infectividad del virus sobre la infectividad del virus respectivo en MEM con 2 mM de CaCl₂.

DISCUSION

*Me vienen estas cosas del fondo de la vida:
acumulando estaba yo me vuelvo reflejo...
agua continuamente cambiada y removida:
así como las cosas, es mudable el espejo.
Alfonsina Storne (Argentina)*

Las infecciones virales están limitadas a especies, tejidos y tipos celulares específicos. Este tropismo se debe a factores del huésped que permiten la replicación viral, dentro de los cuales, uno de los más importantes son los receptores, ya que la infección se inicia a través de la interacción del virus con moléculas específicas en la superficie de la célula blanco. Además de servir como punto inicial de unión, los receptores juegan un papel importante en otros eventos tempranos de la infección, tales como la penetración y el desnudamiento de las partículas virales. Por lo tanto, su caracterización, así como la de los componentes del virus involucrados en las interacciones con el receptor, y los factores que influyen en estas interacciones, son relevantes para entender los mecanismos moleculares de la patogénesis viral.

Para que un virus infecte a una célula, se requiere un conjunto de eventos secuenciales durante los cuales las partículas virales sufren cambios conformacionales, como consecuencia de la(s) interacción(es) de las proteínas virales con moléculas presentes en la superficie celular; estos cambios pueden ser influenciados por la presencia de ciertos iones. Existen varios reportes de que el calcio juega un papel importante tanto en la estabilidad de algunos virus, como en las interacciones iniciales de éstos con su célula huésped. Por ejemplo, se ha observado que este catión participa en la estabilidad de poliomavirus (48), rinovirus (126), SV40 (66), black beetle nodavirus (114), rotavirus (15) y algunos virus de plantas (26, 50, 96), aunque hasta el momento no se ha identificado una secuencia consenso de unión a calcio en las proteínas de estos virus. El calcio también puede influir en la unión de ciertos virus a su receptor, como en el caso del virus de la hepatitis A (9) y del adenovirus tipo 37 (118); y en el caso del virus de la inmunodeficiencia adquirida, HIV-1, se ha observado que el calcio es necesario durante el proceso de fusión entre el virus y la membrana celular (20, 22, 54).

En el caso de los rotavirus se sabe que el calcio juega un papel preponderante durante varias etapas del ciclo replicativo (99). Eventos tales como la estabilidad de la partícula viral, la activación de la transcripción, la morfogénesis del virión y la lisis celular, producto de la infección por rotavirus, dependen de las concentraciones relativas de este ion en los diferentes compartimentos celulares. Interesados en la relación del ion calcio y el ciclo de

infección de rotavirus, en este trabajo nos propusimos evaluar el papel del calcio durante las primeras interacciones de rotavirus con su célula huésped.

Se encontró que la infectividad de los rotavirus es dependiente de la concentración de calcio durante los primeros eventos de la infección. Un aumento de 5 veces la concentración de calcio en el medio extracelular, causa un incremento de la infectividad que varía entre 2 y 50 veces sobre la infectividad basal en 2 mM, dependiendo de la cepa de rotavirus que se estudie. Cabe resaltar que todas las cepas de rotavirus estudiadas, ya sean virus que requieren de ácido siálico (AS) para unirse a su célula huésped y luego infectarla, o virus que no requieren de AS en su infección, todas ellas, presentan un aumento de su infectividad en 10 mM de calcio. Sin embargo, la infectividad de otros virus, como poliovirus y reovirus, no se modificó. También se encontró que este efecto es específico del calcio y no de otros iones divalentes (con excepción del estroncio), lo que indica que el efecto observado no es simplemente debido a las cargas positivas de este ion divalente.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el efecto del calcio es sobre la *partícula viral* ya que diversos experimentos, como la *preincubación de las células en altas concentraciones de calcio*, el aumento de calcio intracelular durante las etapas iniciales de la infección, el efecto del calcio sobre la infectividad de rotavirus en otras líneas celulares (datos no mostrados), la reversibilidad del efecto del calcio en virus en suspensión y los estudios de la fluorescencia intrínseca de la *partícula viral*; indican que el efecto de calcio no es sobre la célula sino sobre la estructura de la *partícula viral*. Sin embargo, no se puede descartar un efecto del calcio sobre alguna interacción del virus con la célula, la cuál se realice de manera temporal, es decir, que el cambio conformacional que el aumento en la concentración de calcio induce en la *partícula*, facilite una interacción del virus con una molécula celular específica .

Las etapas iniciales de una infección involucran varios eventos, tales como: la unión del virus a la célula, la penetración del virus al citoplasma y el desnudamiento de la *partícula viral*. Al analizar el nivel en el que el calcio pudiese estar participando durante la infección viral, se encontró que si bien la unión de los virus en las dos condiciones de calcio (2mM y 10 mM) es similar, aquellos virus que se unen en altas concentraciones de

calcio son más eficientes para los siguientes pasos de la infección, lo que repercute en un aumento de la infectividad.

Para el caso de los rotavirus, un fenómeno bien caracterizado es que del total de partículas virales producidas como resultado de una infección, existe una proporción de partículas virales que no son infecciosas, denominadas partículas físicas. En los rotavirus la relación entre las partículas infecciosas (PI) y las físicas (PF) es variable y depende del origen de la cepa; por ejemplo, se ha determinado que en el caso del virus de simio RRV, la relación PI/PF es de 1/100, mientras que en el caso del rotavirus de origen humano Wa, esta relación es 1/30,000 (81). Las observaciones realizadas en este trabajo indican que el incremento de calcio ocasiona un cambio en la relación PI/PF, de modo que a pesar de que se unen a la célula la misma cantidad de partículas en las dos condiciones de calcio ensayadas, el número de partículas que ingresan a la célula y se replican productivamente, aumenta notablemente en presencia de 10 mM de calcio. Por ejemplo, la infectividad de las cepas de rotavirus de origen humano DS-1 y ST3 aumentan del orden de 50 veces, indicando que la relación PI/PF en condiciones de alto calcio es del orden de 1/600, cercano a los valores obtenidos para cepas de virus animales.

Se ha propuesto que la entrada de los rotavirus a su célula huésped es un proceso de múltiples pasos, en el cuál las proteínas virales interactúan con al menos tres diferentes moléculas celulares en forma secuencial (81). Entre las moléculas que han sido identificadas como posibles receptores para rotavirus están los gangliósidos GM1 y GM3 (46, 97), las glicoproteínas con un peso molecular entre 300-330 Kda (6), las integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_x\beta_2$ y $\alpha_v\beta_3$ (16, 44, 49) y por último la proteína de choque térmico hsc70, aunque no es claro el papel que cumplen todas estas moléculas. Nosotros pensamos que la interacción del virus con estas diferentes moléculas, promueve cambios conformacionales en la partícula, los cuáles permiten la exposición de nuevos dominios responsables de estas interacciones.

Aún no se ha identificado la molécula celular que contiene residuos de AS con la que interaccionan los rotavirus durante su proceso de entrada a la célula. Sin embargo, se sabe que esta interacción es mediada por el dominio VP8 de la proteína VP4 (52, 80). También, se conoce que la variante independiente de AS (aislada del rotavirus RRV que es

dependiente de AS) se une a la célula a través del dominio VP5 de la proteína VP4, utilizando la integrina $\alpha_2\beta_1$ como receptor celular (124, 125). El virus silvestre RRV requiere de las dos interacciones antes descritas, las cuáles se realizan de manera secuencial. Primero, se une a residuos de AS presentes en la superficie celular a través del péptido VP8 y posteriormente el virus se une a la integrina $\alpha_2\beta_1$ a través de VP5 (124). Los rotavirus de origen humano (que son independientes de AS) también se unen a la célula a través de un receptor resistente a neuraminidasa que, sin embargo, no es la integrina $\alpha_2\beta_1$ (1). Recientemente, se encontró que sin importar que molécula utilicen los rotavirus dependientes e independientes de AS en su primera interacción con su célula huésped, después interaccionan con la integrina $\alpha_v\beta_3$ y con la proteína hsc70 (43, 44).

En este trabajo, se encontró que cuando la infección con el virus RRV se realiza en 10 mM de calcio, este virus es menos dependiente de la presencia de residuos de AS en la membrana de la célula; es decir, en estas condiciones la interacción de estos virus a través de VP8, ya no parece ser necesaria para que el virus realice una infección productiva, lo que indica que el calcio induce un cambio en la estructura de la partícula viral que facilita una interacción virus-célula independiente de AS.

Cabe resaltar que la unión de las integrinas a sus ligandos es dependiente de la presencia de cationes, sin embargo se sabe que la unión de la integrina $\alpha_2\beta_1$ a sus ligandos naturales es inhibida por la presencia de calcio (64). Además, cuando se evaluó la infectividad de RRV y nar3 en presencia de anticuerpos específicos contra esta integrina, en calcio 2 mM y 10 mM, no se encontró una diferencia entre las dos condiciones de calcio (datos no mostrados), lo cuál sugiere que el aumento de calcio no favorece la interacción con esta integrina. En base a esta información y sabiendo que el efecto del calcio sobre la infectividad es general para los rotavirus (dependientes e independientes de AS), pensamos que el calcio facilita una interacción virus-célula común a todos los rotavirus, aunque aún no se ha encontrado la molécula celular, ni la proteína viral involucrada en esta interacción.

Con el fin de evaluar cambios conformacionales en el virión, usamos métodos indirectos como exposición de las partículas virales al calor y métodos directos como la fluorescencia intrínseca de la partícula viral. Encontramos que en calcio 10 mM los virus son más resistentes al efecto del calor, lo cuál sugiere que el aumento de la concentración

de calcio ocasiona un cambio en la estructura del virión, permitiéndole mayor estabilidad a más altas temperaturas. Basados en esta observación, aislamos variantes termoresistentes, teniendo como hipótesis, que los cambios que estas variantes presenten en su secuencia le permitan simular el efecto del calcio sobre la infectividad viral. Datos preliminares de su caracterización, nos indican que estas variantes tienen un fenotipo de resistencia a la temperatura, su infectividad es independiente de la presencia de AS en la superficie celular y no presentan un aumento de su infectividad en alto calcio (10 mM), en comparación con el virus silvestre (datos no mostrados). En el futuro, cuando se complete la caracterización de estas variantes se podrá saber con que gen segrega este fenotipo y se establecerá su relación o no relación con el efecto del calcio.

Los estudios de fluorescencia de la partícula de rotavirus, nos revelaron un aumento de la intensidad de la fluorescencia de las TLPs de los rotavirus en 10 mM de calcio respecto al control en 2 mM, lo que sugiere un posible cambio conformacional en la partícula viral inducida por el aumento de la concentración de calcio. Existen varios ejemplos en la literatura sobre estudios de fluorescencia de proteínas (61), el corrimiento del pico de emisión indica un cambio en el entorno de los triptofanos, ya sea hacia un ambiente más hidrofóbico (corrimiento hacia el azul) o hacia un ambiente más hidrofílico (corrimiento hacia el rojo). El aumento en la intensidad de la fluorescencia sugiere un cambio conformacional, el cual debe ser corroborado por estudios de apagamiento de la fluorescencia. En el caso de los virus, recientemente se ha reportado cambios conformacionales en el virus de la vesicular estomatitis inducidos por pH, estos cambios fueron evaluados mediante la fluorescencia intrínseca de la partícula viral (12) El cambio en la intensidad de la fluorescencia intrínseca de los rotavirus se observó en las TLPs de los virus RRV, nar3 y Wa (dependientes e independientes de AS). Sin embargo, este cambio no se observó en las DLPs (partículas sin las proteínas de la capa externa), lo que sugiere que el cambio conformacional que el aumento de la concentración de calcio induce en la partícula viral es en las proteínas de la capa externa VP4 y VP7, y coincidentemente éstas son las proteínas involucradas en los primeros contactos del virus con la célula.

El apagamiento de la fluorescencia, es una herramienta utilizada para definir el ambiente en que se encuentran los triptofanos. Para esto, se usan diferentes moléculas (apagadores) que después de impactar con el fluoróforo excitado extraen su energía,

difundiéndola como calor y así impiden la emisión de la fluorescencia. De estos apagadores los más utilizados son el la acrilamida y el yoduro (61). La acrilamida difunde en ambientes hidrofóbicos y apaga la fluorescencia tanto de residuos expuestos al solvente como de aquellos que se encuentran más internos (protegidos) en la estructura de la proteína. Por el contrario, el yoduro dada su naturaleza química no difunde a través de ambientes hidrofóbicos, por lo que sólo puede apagar la fluorescencia de los residuos más externos, es decir los expuestos al solvente.

El estudio de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de las TLPs de los rotavirus RRV y nar3 en presencia de yoduro, nos muestran que existe una diferencia en la exposición de triptofanos en las condiciones de 2 mM y de 10 mM CaCl_2 en el medio. Para las TLPs de RRV es de un 10% y para nar3 es de un 18%. Estos resultados indican que el aumento de la concentración de calcio en el medio, causó un cambio conformacional en la partícula viral, el cuál permite la exposición de nuevas regiones del virus que posiblemente favorecen un mejor contacto del virus con la membrana celular, y esto conlleva a un aumento de la infectividad viral. Este efecto del calcio sobre una proteína no es sorprendente, dada la implicación biológica que tiene este ión en diferentes procesos celulares, se conoce el calcio origina cambios en la estructura de muchas proteínas, permitiendo la exposición de superficies hidrofóbicas involucradas en uniones peptídicas. Este es el caso, por ejemplo de las proteínas que presentan el motivo de unión a calcio (EF hand), calmodulina, troponinaC, parvalbumina, etc (51). Cabe resaltar, que muchos virus unen calcio, sin embargo aún no se ha encontrado una secuencia consenso de unión a calcio en éstas proteínas virales (99) y muchas de ellas no presentan el motivo EF hand en su secuencia. En este trabajo, se detectó por primera vez un cambio conformacional en el rotavirus completo, aunque aún no se conoce que región peptídica esta involucrada en este cambio.

Respecto a la proteína viral que podría ser modificada por el calcio, un buen candidato podría ser proteína VP7, ya que se ha demostrado que esta proteína une calcio y se sabe de hecho, que la conformación trimérica de esta proteína depende de la concentración de calcio en el medio (23, 24). Recientemente, en estudios comparativos de la estructura tridimensional del rotavirus SA114f tratado y no tratado con tripsina, determinada por criomicroscopía electrónica, se encontró que la estructura de VP4 puede alterar la

conformación de VP7 en la partícula viral (17). Cabe mencionar, que cuando se analizó el efecto del calcio en virus tratados y no tratados con tripsina, se encontró que en 10 mM de calcio los virus no cortados proteolíticamente también presentan un aumento de la infectividad respecto a su control en 2 mM (datos no mostrados). Pensamos que, como consecuencia de las interacciones iniciales del virus con la célula a través de la proteína VP4, posiblemente se exponen nuevos sitios de interacción en la partícula viral, en los que pudiera estar involucrada la proteína VP7. Los resultados de este trabajo sugieren, que al aumentar la concentración de calcio en el medio, se inducen cambios conformacionales en la partícula viral, que probablemente favorecen contactos con la célula posteriores a la primera interacción; queda aún por determinar que interacción virus-célula es la favorecida por este cambio en la conformación de la partícula viral.

Recientemente, se ha reportado que la integrina $\alpha_v\beta_3$ está involucrada en el proceso de entrada del virus a la célula (dependientes e independientes de AS), en un paso posterior a su primer contacto con la membrana celular. Por otro lado, se ha visto que la interacción de los rotavirus con la integrina $\alpha_v\beta_3$ es independiente del ligando RGD. Sin embargo, se encontró una región conservada entre la proteína externa de hantavirus (virus que interacciona con la integrina $\alpha_v\beta_3$ de forma independiente al ligando RGD (41)) y la proteína VP7 de rotavirus (43), región que podría ser responsable de la interacción de estos virus con la integrina $\alpha_v\beta_3$. Se conoce que la unión de este tipo de integrina a su ligando RGD en la proteína osteopontina es dependiente de la presencia de iones Mn^{+2} y es inhibida por iones Ca^{+2} . Se ha sugerido que las integrinas poseen diferentes sitios de unión para los cationes y que éstos influyen en sus cambios conformacionales y así regulan la unión con sus ligandos (47). Dado que no se conoce que interacción del virus con la célula es facilitada por la presencia de calcio, en un futuro se puede estudiar si la unión de la integrina $\alpha_v\beta_3$, independiente del ligando RGD es dependiente de calcio en el medio (107).

Por último, es importante resaltar que la infección por rotavirus es limitada a niños menores de 2 años y a las crías de mamíferos. Además estos virus presentan un tropismo celular sumamente específico, infectando únicamente a los enterocitos de las puntas de las vellosidades intestinales (58). Las células epiteliales que conforman el tracto digestivo

están expuestas a una gran variación en la concentración de calcio, dada principalmente por la ingesta de este ión en el alimento, el cual para niños menores de 2 años es principalmente la leche. Estudios de nutrición indican que el contenido de calcio en la leche materna es de aproximadamente 10 mM (77, 82). Es interesante notar, que si bien la leche materna provee al niño de una adecuada nutrición y le brinda cierta protección inmunológica, en el caso de los rotavirus posiblemente como resultado de un proceso de adaptación de estos virus a su medio ambiente, el calcio en concentraciones de 10 mM provee al virus de un adecuado microambiente para una mejor infección.

CONCLUSIONES

*El camino al conocimiento es largo y penoso,
muchas son las veredas por las que uno se puede extraviar,
y al final la única recompensa es la satisfacción del trabajo cumplido.
Emmanuel Kant.*

- La infectividad de los rotavirus es dependiente de la concentración de calcio en el medio, durante los primeros eventos de la infección.
- El efecto del calcio sobre la infectividad viral es específico de este ión y es general para todas las cepas de rotavirus que se analizaron.
- El efecto del calcio es sobre la partícula viral.
- El aumento de la concentración de calcio no promueve que un mayor número de partículas virales se unan a la célula, sin embargo, origina un cambio en la relación entre partículas físicas y partículas infecciosas, que repercute en el aumento de la infectividad viral.
- El incremento en la concentración de calcio promueve una interacción virus-célula independiente de la presencia de ácido siálico en la membrana celular.
- El aumento de calcio induce un cambio conformacional en la partícula viral, que se evidencia por una mayor exposición de triptofanos.

PERSPECTIVAS

*El futuro es espacio, espacio color de tierra
color de nube, color de agua, de aire
espacio negro para muchos sueños...
espacio blanco para toda la nieve
para toda la música
Pablo Neruda (Chile)*

1) Identificar que interacción virus-célula es facilitada en presencia de calcio.

En este trabajo se demostró que el aumento de la concentración de calcio durante los primeros eventos de la infección de rotavirus, causa un incremento de la infectividad viral. Sin embargo, queda por determinar que interacción inicial del virus con la célula es facilitada o depende de la concentración de calcio en el medio. Cabe mencionar que el aumento de calcio no induce que un mayor número de partículas se una a la célula, por ello pensamos que el calcio promueve una interacción posterior a los primeros contactos del virus con la célula, posiblemente con moléculas involucradas en la penetración del virus al citoplasma celular. Por esto, es necesario implementar en nuestro laboratorio, una técnica que permita la medición de la entrada de los rotavirus a la célula, ya que la entrada de rotavirus mediada por la coentrada de sarcina presenta ciertos inconvenientes, por ejemplo que el aumento de calcio en el medio externo promueve la entrada de sarcina en ausencia del virus y a que aún no se conoce el mecanismo por el cuál entra la sarcina. Después de estandarizar otra técnica para medir la entrada de rotavirus a la célula, se pueden realizar mediciones de entrada del virus en presencia de anticuerpos dirigidos contra las proteínas candidatas en este paso de la infección (hasta el momento la integrina $\alpha_v\beta_3$ y la proteína de choque térmico hsc 70) en calcio 2 mM y 10 mM.

2) Identificar que cambios produce el aumento de calcio en la partícula viral.

Recientemente se publicó que la conformación trimérica de la proteína VP7 depende de la presencia de calcio en el medio (24). Mediante estudios de mutagénesis dirigida de la proteína VP7 se pueden determinar los dominios involucrados en la unión a calcio y que papel juegan estos dominios en la infección de los rotavirus. Por otro lado, con la proteína VP7 purificada se puede hacer estudios de caracterización bioquímica de esta proteína en las diferentes condiciones de calcio, ya sea por estudios de fluorescencia o de dicroísmo circular. No podemos descartar que el calcio puede influir en la interacción de las proteínas VP7 y VP4, aún no se conoce las regiones de éstas proteínas involucradas en estos contactos.

3) Caracterización de la variantes de RRV termoresistentes.

Durante este trabajo se aislaron variantes de rotavirus RRV termoresistentes, con el objetivo de evaluar si estas variantes podrían simular el efecto del calcio sobre la infectividad. La caracterización fenotípica y genotípica de estas variantes dará información acerca de la proteína viral involucrada en dicho fenotipo. Se evaluará el fenotipo de estas variantes respecto a su infectividad en células tratadas con neuraminidasa y su infectividad en calcio alto (10 mM). Mediante transfecciones de las DLPs de estas variantes se evaluará si el cambio en su secuencia favorece alguna etapa del ciclo de replicación que ocurra en el citoplasma celular. Nuestra hipótesis es, que los cambios en la secuencia se dieron en las proteínas de la capa externa, ya que son las que entran en contacto con la célula, sin embargo no se puede descartar un efecto sobre alguna proteína interna, lo cuál pueda favorecer su replicación. Si los cambios son en las proteínas de la capa externa, la candidata sería VP7 ya que es la proteína que une calcio, aunque como esta proteína interacciona con VP4 no se puede descartar que cambios en la secuencia de VP4 alteren la estructura de la proteína VP7.

REFERENCIAS

*... ..y si despues de tantas palabras,
no sobrevive la palabra... .
Cesar Vallejo (Perú)*

1. **Arias, C. F., C. A. Guerrero, E. Méndez, S. Zárate, P. Isa, R. Espinoza, P. Romero, and S. López** 2001. Gastroenteritis viruses. Novartis Foundation Symposium 238. Jhon Wiley & sons Ltd., Chichester, England.
2. **Arias, C. F., M. Lizano, and S. López** 1987. Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J. Gen. Virol.* **68**:633-642.
3. **Arias, C. F., S. Lopez, and R. Espejo** 1982. Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome *J. Virol.* **41**:42-50.
4. **Arias, C. F., P. Romero, V. Alvarez, and S. López** 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.* **70**:5832-5839.
5. **Bass, D., M. Baylor, C. Chen, and U. Upadhyayula** 1995. Dansylcadaverine and cytochalasin D enhance rotavirus infection of murine L cells *Virology.* **212**:429-437.
6. **Bass, D. M., E. R. Mackow, and H. B. Greenberg** 1991. Identification and partial characterization of a rhesus rotavirus binding glycoprotein on murine enterocytes *Virol.* **183**:602-10.
7. **Bastardo, J. W., and I. H. Holmes** 1980. Attachment of SA-11 rotavirus to erythrocyte receptors *Infect. Immun.* **29**:1134-1140.
8. **Bican, P., J. Cohen, A. Charpilienne, and R. Scherrer** 1982. Purification and characterization of bovine rotavirus cores *J. Virol.* **43**:1113-1117.
9. **Bishop, N. E., and D. A. Anderson** 1997. Early interaction of hepatitis A with cultured cells: viral elution and the effect of pH and calcium ions. *Arch. Virol.* **142**:2161-2178.
10. **Bishop, R., G. Davidson, I. Homes, and B. Ruck** 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet*:1281-1283.
11. **Bresse, J. S., R. I. Glass, B. Ivanoff, and J. R. Gentsch** 1999. Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries *Vaccine.* **17**:2207-2222.
12. **Carneiro, F. A., A. S. Ferradosa, and A. T. Da Poian** 2001. Low pH-induced conformational changes in vesicular stomatitis virus glycoprotein involve dramatic structure reorganization *J. Biol. Chem.* **276**:62-67.
13. **Chen, D., J. W. Burns, M. K. Estes, and R. F. Ramig** 1989. Phenotypes of rotavirus reassortants depend upon the recipient genetic background *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**:3743-7.
14. **Chen, D. Y., M. K. Estes, and R. F. Ramig** 1992. Specific interactions between rotavirus outer capsid proteins VP4 y VP7 determine expression of a cross-reactive, neutralizing VP4-specific epitope *J. Virol.* **66**:432-439.
15. **Cohen, J., J. Laporte, A. Charpilienne, and R. Scherer** 1979. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* **60**:177-182.
16. **Coulson, B. S., S. L. Londrigan, and D. J. Lee** 1997. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:5389-94.
17. **Crawford, S. E., S. K. Mukherjee, M. K. Estes, J. A. Lawton, A. L. Shaw, R. F. Ramig, and B. V. V. Prasad** 2001. Trypsin cleavage stabilizes of rotavirus VP4 spike *J. Virol.* **75**:6052-6061.
18. **Cuadras, M. A., C. F. Arias, and S. Lopez** 1997. Rotaviruses induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca^{2+} concentration to initiate their replication cycle *J Virol.* **71**:9065-74.
19. **Desselberg, U.** 2000. Rotaviruses. *Methods and Protocols.* Humana Press Inc., New Jersey, USA.
20. **Dimitrov, D., C. Broder, E. Berger, and R. Blumenthal** 1993. Calcium ions required for cell fusion mediated by CD4-Human immunodeficiency Virus Type I envelope glycoprotein interaction *J. Virol.* **67**:1647-1652.
21. **Dong, Y., C. Q. Y. Zeng, J. Ball, M. K. Estes, and A. Morris** 1997. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:3960-3965.

22. **Doranz, B. J., S. S. Baik, and R. W. Doms** 1999. Use of gp120 binding assay to dissect the requirements and kinetics of human immunodeficiency virus fusion events. *J. Virol.* **73**:10346-10358.
23. **Dormitzer, P., and H. Greenberg** 1992. Calcium chelation induces a conformational change in recombinant Herpes Simplex Virus-1 expressed rotavirus VP7. *Viol.* **189**:420-428.
24. **Dormitzer, P., H. Greenberg, and S. C. Harrison** 2000. Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers *Virology.* **277**:420 - 428.
25. **Dowling, W., E. Denisova, R. LaMonica, and E. R. Mackow** 2000. selective membrane permeabilization by the rotavirus VP5 protein is abrogated by mutations in an internal hydrophobic domain *J. Virol.* **74**:6368-6376.
26. **Durham, A., and D. Hendry** 1977. Cation binding by tobacco mosaic virus *Viol.* **77**:510 - 519.
27. **Ericson, B. L., D. Y. Graham, B. B. Mason, and M. K. Estes** 1982. Identification, synthesis, and modifications of simian rotavirus SA11 polypeptides in infected cells *J. Virol.* **42**:825-839.
28. **Espejo, R., E. Martinez, S. López, and O. Munoz** 1980. Different polypeptide composition of two human rotavirus types *Infect. Immun.* **28**:230-237.
29. **Estes, M. K.** 1996. Rotaviruses and their replication, Third edition ed, vol. 2. Raven Press, New York.
30. **Estes, M. K., D. Y. Graham, E. M. Smith, and C. P. Gerba** 1979. Rotavirus stability and inactivation *J. Gen. Virol.* **43**:403-409.
31. **Estes, M. K., and C. J.** 1989. Rotavirus gen structure and function *Microbiol. Rev.* **53**:410-449.
32. **Flewett, T. H., A. S. Bryden, H. Davies, G. N. Woode, and J. C. Bridger** 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet.* **2**:61-63.
33. **Flint, S. J., E. L.W., R. M. Krug, V. R. Racaniello, and A. M. Shalka** 2000. Principles of virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control., Washington,DC.
34. **Foster, S. O., E. L. Palmer, J. G. W. Gary, M. L. Martin, K. L. Herrman, P. Beasley, and J. Sampson** 1980. Gastroenteritis due to rotavirus in an isolated Pacific island group: an epidemic of 3,439 cases. *J. Infect. Dis.* **141**:32-9.
35. **Fuentes-Panama, E. M., S. Lopez, M. Gorziglia, and C. F. Arias** 1995. Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses *J. Virol.* **69**:2629-2632.
36. **Fukudome, K., O. Yoshie, and T. Konno** 1989. Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption *Virology.* **172**:196-205.
37. **Fukuhara, N., O. Yoshie, S. Kitaoka, and T. Konno** 1988. Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7 *J. Virol.* **62**:2209-18.
38. **Gajardo, R., P. Vende, D. Poncet, and J. Cohen** 1997. Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein *J. Virol.* **71**:2211-2216.
39. **Gallegos, C. O., and J. T. Patton** 1989. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles *Virology.* **172**:616-627.
40. **Garcia, E., Y. Ayala, E. Di Cera, and E. Groisman** 1997. Characterization of the bacterial sensor protein phoQ *J. Biol. Chem.* **272**:1440-1443.
41. **Gavrilovskaya, M., N. Irina, R. Shaw, M. Ginnsberg, and E. R. Mackow** 1998. Beta3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:7074-7079.
42. **Greber, U. F., I. Singh, and A. Helenius** 1994. mechanism of virus uncoating *Trends Microbiol.* **2**:52-56.
43. **Guerrero, C. A.** 2000. Universidad Nacional Autónoma de México.
44. **Guerrero, C. A., E. Mendez, S. Zarate, P. Isa, S. Lopez, and C. F. Arias** 2000b. Integrin mediates rotavirus cell entry *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:14644-14649.
45. **Guerrero, C. A., S. Zarate, G. Corkidi, S. Lopez, and C. F. Arias** 2000a. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells *J. Virol.* **74**:9362-9371.

46. **Guo, C., O. Nakagomi, M. Mochizuki, H. Ishida, M. Kiso, Y. Ohta, T. Suzuki, D. Miyamoto, K. I. Jwa Hidari, and Y. Suzuki** 1999. Ganglioside GM1a on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains I. *J. Biochem. (Tokyo)*. **126**:683-688.
47. **Hass, T. A., and E. F. Plow** 1994. Integrin-ligand interactions: a year in review. *Current Opinion in Cell Biology*. **6**:656-662.
48. **Haynes II, J. I., C. Deching, and R. A. Consigli** 1993. Mutations in the putative calcium-binding domain of polyomavirus VP1 affect capsid assembly. *J. Virol.* **67**:2486-2495.
49. **Hewish, M. J., Y. Takada, and B. S. Coulson** 2000. Integrins $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_4\beta_1$ can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J. Virol.* **74**:228-236.
50. **Hull, R.** 1978. The stabilization of the particles of turnip rosette virus. III. Divalent cation. *Virology*. **89**:418-422.
51. **Ikura, M.** 1996. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem. Sci.* **21**:14-27.
52. **Isa, P., S. Lopez, L. Segovia, and C. F. Arias** 1997. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J. Virol.* **71**:6749-6756.
53. **Jacobson, R. M.** 1999. The current status of rotavirus vaccine. *Vaccine*. **17**:1690-9.
54. **Jernigan, K., R. Blumenthal, and A. Puri** 2000. Varying effects of temperature, Ca^{2+} and cytochalasin on fusion activity mediated by immunodeficiency virus type 1 and type 2 glycoproteins. *FEBS Letters*. **474**:246-251.
55. **Johansen, K., and L. Svensson** 1997. Neutralization of rotavirus and recognition of immunologically important epitopes on VP4 and VP7 by human IgA. *Arch. of Virol.* **142**:1491-8.
56. **Kabcenell, A. K., and P. H. Atkinson** 1985. Processing of the rough endoplasmic reticulum membrane glycoproteins of rotavirus SA11. *J. Cell Biol.* **101**.
57. **Kaljot, K. T., R. D. Shaw, D. H. Rubin, and H. B. Greenberg** 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* **62**:1136-44.
58. **Kapikian, A. Z., and R. M. Chanock** 1996. *Rotaviruses*, vol. 2. Raven Press, New York.
59. **Keljo, D. J., and A. K. Smith** 1988. Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **7**:249-56.
60. **Kozak, M.** 1981. Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* **9**:5233-5250.
61. **Lakowicz, J. R.** 1986. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Ed. ed. Plenum Press, New York, USA.
62. **Lawton, J. A., M. K. Estes, and B. V. V. Prasad** 1997. Three-dimensional visualization of RNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nature Structural Biology*. **4**:118-121.
63. **Lehrer, S. S.** 1971. Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochem. J.* **10**:3254-3263.
64. **Leitinger, B., A. Mac Dowall, P. Stanley, and N. Hogg** 2000. The regulation of integrin function by Ca^{2+} . *Biochim. Biophys. Acta.* **1498**:91-8.
65. **Lepault, J., I. Petitpas, I. Erk, J. Navaza, D. Bigot, M. Dona, P. Vachette, J. Cohen, and F. A. Rey** 2001. Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus Embo. *J.* **20**:1498-507.
66. **Liddington, R., Y. Yan, J. Moulai, R. Sahli, T. Benjamin, and S. Harrison** 1991. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature*. **354**:278-284.
67. **Liu, M., N. M. Mattion, and M. K. Estes** 1992. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology*. **188**:77-84.
68. **Lopez, S., C. F. Arias, J. R. Bell, J. H. Strauss, and R. T. Espejo** 1985. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology*. **144**:11-19.
69. **Lopez, S., I. Lopez, P. Romero, E. Mendez, X. Soberon, and C. F. Arias** 1991. Rotavirus YM gene 4: analysis of its deduced amino acid sequence and prediction of the secondary structure of the VP4 protein. *J. Virol.* **65**:3738-3745.

70. **Ludert, J. E., N. Feng, J. H. Yu, R. L. Broome, Y. Hoshino, and H. B. Greenberg** 1996. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo *J Virol.* **70**:487-93.
71. **Ludert, J. E., F. Michelangeli, F. Gil, F. Liprandi, and J. Esparza** 1987. Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology.* **27**:95-101.
72. **Maas, D. R., and P. H. Atkinson** 1994. Retention by endoplasmic reticulum of rotavirus VP7 is controlled by three adjacent amino-terminal residues *J.Virol.* **68**:366-378.
73. **Mackow, E. R., R. D. Shaw, S. M. Matsui, P. T. Vo, M. N. Dang, and H. B. Greenberg** 1988. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**:645-9.
74. **Manes, S., G. Del Real, R. A. Lacalle, P. Lucas, C. Gomez-Mouton, S. Sanchez, R. Delgado, J. Alcamí, E. Mira, and A. C. Martínez** 2000. membrane rafts microdomains mediate late assembly required for HIV-1 infection *Embo Rep.* **Aug (1)**:190-6.
75. **Mansell, E. A., R. F. Ramig, and J. T. Patton** 1994. Temperature-sensitive lesions in the capsid proteins of the rotavirus mutants tsF and tsG that affect virion assembly *Virology.* **204**:69-81.
76. **Mass, D. R., and P. H. Atkinson** 1990. Rotavirus proteins VP7, NS28 and VP4 form oligomeric structures *J.Virol.* **64**:2632-2641.
77. **Mataloun, M. M., and C. R. Leone** 2000. Human milk mineral intake and serum concentrations of calcium and phosphorus in newborn term infants: influence of an intrauterine growth restriction. *Acta Paediatr.* **89**:1093-1097.
78. **McCrae, M. A., and J. G. McCorquodale** 1983. Molecular biology of rotaviruses. V terminal structure of viral RNAspecies *Virol.* **126**:204-212.
79. **Mendez, E., C. F. Arias, and S. Lopez** 1996. Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J. Virol.* **70**:1218-22.
80. **Méndez, E., C. F. Arias, and S. López** 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* **67**:5253-5259.
81. **Mendez, E., S. Lopez, M. A. Cuadras, P. Romero, and C. F. Arias** 1999. Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology.* **263**:450-459.
82. **Meschy, F.** 2000. Recent progress in the assessment of mineral requirements of goats. *Livestock Prod Sci.* **64**:9-14.
83. **Michelangeli, F., M. C. Ruiz, J. Del Castillo, J. Ludert, and F. Liprandi** 1991. Effect of rotavirus infection on intracellular calcium homeostasis in cultured cells *Virol.* **181**:520-527.
84. **Missiaen, L., J. Parys, A. Weidema, H. Sipma, S. Vanlingen, P. De Smet, G. Callewaert, and H. De Smedt** 1999. The bell-shaped Ca^{2+} dependence of the inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca^{2+} release is modulated by Ca^{2+} /calmodulin *J. Biol. Chem.* **274**:13748-13751.
85. **Munro, S., and H. R. B. Pelham** 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER protein cells *Cell.* **48**:899-907.
86. **Nakagomi, O., and T. Nakagomi** 1991. Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus *Arch. of Virol.* **120**:43-55.
87. **Patton, J. T.** 1995. Structure and function of the rotaviruses RNA-binding proteins *J. Gen. Virol.* **76**:2633-2644.
88. **Patton, J. T., and D. Y. Chen** 1999. RNA-binding and capping activities of proteins rotavirus open cores *J.Virol.* **73**:1382-1391.
89. **Patton, J. T., and E. Spencert** 2000. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virol.* **277**:217-225.
90. **Pizarro, J. M., J. L. Pizarro, J. Fernandez, A. M. Sandino, and E. Spencer** 1991. Effect of nucleotide analogues on rotavirus transcription and replication *Virology.* **184**:768-772.
91. **Poruchynsky, M., D. R. Maass, and P. H. Atkinson** 1991. Calcium depletion blocks the maturation of rotavirus by altering the oligomerization of virus-encoded proteins in the ER. *J.Cell.Biol.* **114**:651-661.

92. **Poruchynsky, M., C. Tyndall, G. W. Both, F. Sato, R. Bellamy, and P. H. Atkinson** 1985. Deletions into an NH₂-terminal hydrophobic domain result in secretion of rotavirus VP7, a resident endoplasmic reticulum membrane glycoprotein *J.Cell.Biol.* **101**:2199-2209.
93. **Prasad, B. V. V., J. W. Burns, E. Marietta, M. K. Estes, and W. Chiu** 1990. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy *Nature.* **343**:476-9.
94. **Prasad, B. V. V., and W. Chiu** 1994. Structure of rotavirus *Curr. Trop. Microbiol. Immunology.* **185**:9-29.
95. **Prasad, B. V. V., G. J. Wang, J. P. Clerx, and W. Chiu** 1988. Three-dimensional structure of rotavirus *J.Mol.Biol.* **199**:269-275.
96. **Robinson, I., and S. Harrison** 1982. Structure of expanded state of tomato bushy stunt virus *Nature (London).* **297**:563-568.
97. **Rolsma, M. D., T. B. Kuhlenschmidt, H. B. Gelberg, and M. S. Kuhlenschmidt** 1998. Structure and function of a ganglioside receptor for porcine rotavirus *J.Virol.* **72**:9079-9091.
98. **Rosenberger, C. M., J. H. Brumell, and B. B. Finlay** 2000. Lipid rafts as pathogen portals *Current Biology.* **10**:823-825.
99. **Ruiz, M. C., J. Cohen, and F. Michelangeli** 2000. Role of Ca⁺² in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infectious. *Cell Calcium*:137-149.
100. **Sandino, A. M., M. Jashes, G. Faundez, and E. Spencer** 1986. Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription *J.Virol.* **60**:797-802.
101. **Santi, C. M., T. Santos, A. Hernandez-Cruz, and A. Darszon** 1998. Properties of a novel pH-dependent Ca²⁺ permeation pathway present in male germ cells with possible roles in spermatogenesis and mature sperm function. *J.Gen.Physiol.* **112**:33-53.
102. **Sharabari, M. S., and P. W. Lee** 1987. Bovine rotavirus maturation is a calcium dependent process *Virology.* **158**:103-111.
103. **Sharabari, M. S., and P. W. Lee** 1986. Bovine rotavirus maturation is a calcium dependent process. *Virology.* **152**:298-307.
104. **Shirley, J. A., G. M. Beards, M. E. Thouless, and T. H. Flewett** 1981. The influence of divalent cations on the stability of human rotavirus *Arch. of Virol.* **67**:1-9.
105. **Simons, K., and E. Ikonen** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* **387**:569-572.
106. **Slavik, J.** 1993. *Fluorescent probes in Cellular and Molecular Biology.* CRC Press Inc., Boca Raton.
107. **Smith, J. W., and D. Mathis** 1994. A mechanism for divalent cation regulation of beta3 integrins. *J. Biol. Chem.* **269**:960-967.
108. **Stirzaker, S. C., and G. W. Both** 1989. The signal peptide of the rotavirus glycoprotein VP7 is essential for its retention in the ER as an integral membrane protein *Cell.* **56**:741-747.
109. **Suzuki, H., S. Kitaoka, T. Konno, T. Sato, and N. Ishida** 1985. Two modes of human rotavirus entry into MA104 cells *Arch. Virol.* **85**:25-34.
110. **Suzuki, H., T. Konno, and Y. Numazaki** 1993. Electron microscopic evidence for budding process-independent assembly of double-shelled rotavirus particles during passage through endoplasmic reticulum membranes *J. Gen. Virol.* **74**:2015-2018.
111. **Svensson, L., P. R. Dormitzer, V. B.C., L. Maunula, and H. B. Greenberg** 1994. Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly *J.Virol.* **68**:5204-5215.
112. **Vesikari, T.** 1997. Rotavirus vaccines against diarrhoeal disease. *Lancet.* **350**:1538-1541.
113. **Vicent, S., D. Gerlier, and S. N. Manie** 2000. Measles virus assembly within membrane rafts *J.Virol.* **74**:9911-5.
114. **Wery, J. P., V. S. Reddy, M. V. Hosur, and J. E. Johnson** 1994. The refined three-dimensional structure of an insect virus at 2.8Å resolution. *J. Mol. Biol.* **235**:565-586.
115. **West-Betengheri, J., G. Deepe, E. Di Cera, and E. Goldman** 1998. Histoplasma acquisition of calcium and expression of CBP1 during intracellular parasitism. *Mol. Microb.* **27**:531-539.

116. **White, D. O., and F. J. Fenner** 1994. Medical virology, Fourth ed. Academic Press, INC., San Diego, California.
117. **Wickham, T. J., R. R. Granados, H. A. Wood, D. A. Hammer, and M. L. Shuler** 1990. General analysis of receptor mediated viral attachment to cell surfaces *Biophys. J.* **58**:1501-16.
118. **Wu, E., J. Fernandez, S. K. Fleck, D. J. Von Seggern, S. Huang, and G. R. Nemerow** 2001. A 50-kDa Membrane Protein Mediates Sialic Acid-Independent Binding and Infection of Conjunctival Cells by Adenovirus Type 37. *Virol.* **279**:78-89.
119. **Xu, Z., and G. Woode** 1994. Studies on the influence of the VP7 gene on rotavirus replication *Virol.* **198**:394-398.
120. **Yamamoto, K., H. Nakayama, K. Nunoi, and M. JFujishima** 1987. Interaction of calmodulin I and the troponin-tropomyosin-actin complex Effect of Ca^{2+} and Sr^{2+} ions. *Biochem. J.* **241**:905-909.
121. **Yang, Y.-W., and C.-C. Teng** 1998. Circular dichroism and fluorescence studies of polyomavirus major capsid protein VP1. *J. Prot. Chem.* **17**:61-71.
122. **Yeager, M., K. A. Dryden, N. H. Olson, H. B. Greenberg, and T. S. Baker** 1990. Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction *J.Cell.Biol.* **110**:2133-2144.
123. **Yolken, R. H., R. Willoughby, S. B. Wee, R. L. Miskuff, and S. Vonderfetched** 1987. Sialic acid glycoproteins inhibit *in vitro* and *in vivo* replication of rotaviruses *J. Clin. Invest.* **79**:148-154.
124. **Zarate, S., R. Espinosa, P. Romero, C. A. Guerrero, C. F. Arias, and S. Lopez** 2000b. Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3 *Virol.* **278**:500 -504.
125. **Zarate, S., R. Espinosa, P. Romero, E. Mendez, C. F. Arias, and S. Lopez** 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J. Virol.* **74**:593-599.
126. **Zhao, R., A. T. Hadfield, M. J. Kremer, and M. G. Rossmann** 1997. Cations in human rhinoviruses *Virol.* **227**:13-23.

APENDICE

Quien no conoce nada, no ama nada.

Quien no puede hacer nada, no comprende nada..

Quien nada comprende, nada vale.

Pero quien comprende, tambien ama, observa, ve...

Cuanto mayor es el conocimiento inherente a una cosa, más grande es el amor...

Quien cree que todas las frutas maduran al mismo tiempo que las frutillas, nada sabe acerca de las uvas.

Paracelso

Date: Tue, 18 Dec 2001 14:42:07 -0500
From: Vivian Kirkwood <kirkwood@microbio.emory.edu>
To: susana@ibt.unam.mx
Subject: RE: Manuscript #RA-VY01-34

Dear Dr. Lopez,

Your manuscript entitled "Influence of calcium on the early steps rotavirus infection" has been accepted for publication in Virology will be contacted by the Virology Editorial Office shortly concern publication procedures.

With best wishes.

Sincerely,

Rafi Ahmed, Ph.D.

RA/vk

Influence of Calcium on the Early Steps of Rotavirus Infection

Victoria Pando, Pavel Isa, Carlos F. Arias and Susana López*.

Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico.

Running title: Effect of calcium in rotavirus entry

*Corresponding author mailing address: Departamento de Genética y Fisiología
Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico.
Phone: (52) (73) 291615. Fax: (52) (73) 172388.
E-Mail address: susana@ibt.unam.mx

ABSTRACT

The structure of rotaviruses and many steps of their replication cycle, depend on the concentration of calcium in the microenvironment. In this work, to learn about the role of calcium during the early steps of the infection, we characterized the effect of increasing the calcium concentration in the medium on the infectivity of rotaviruses. We found that a 5-fold increase in the calcium concentration of the cell culture medium results in an increased viral titer in all rotavirus strains tested. The effect of this divalent ion seems to be mainly on the viral particle, and not on the surface of the cell. Analysis of the intrinsic fluorescence spectra of purified triple layered particles (TLPs) revealed that changes in the environment of tryptophan residues occurred as calcium concentration increased, suggesting that conformational changes in the viral particle might be responsible for the effect of this ion on the viral infectivity.

Key Words:

Rotavirus

Rotavirus Infectivity

Viral entry

Calcium

Intrinsic Fluorescence

Conformational Changes

INTRODUCTION

Rotaviruses are the major cause of severe acute diarrhea of infants and young children under two years of age, and are important pathogens in the young of many avian and mammalian species. These agents, members of the family *Reoviridae*, are nonenveloped icosahedric viruses consisting of three concentric layers of protein that surround the genome composed of eleven segments of double stranded RNA. The outermost layer is composed of two proteins, VP4 and VP7, which are responsible for the initial interactions of the virus with the host cell. The smooth external surface of the virus is made up of 780 copies of glycoprotein VP7 arranged in trimers, and of 120 copies of protein VP4, which form 60 dimeric spike-like structures that extend from the surface of the particle (Estes, 1996).

VP4 has essential functions in the early virus-cell interactions, including receptor binding and cell penetration (Crawford et al., 1994; Ludert et al., 1996; Mendez, Arias, and Lopez, 1996; Zarate et al., 2000). This protein is cleaved by trypsin into subunits VP5 and VP8, and it has been shown that this proteolytic treatment results in an enhancement of rotavirus infectivity (Arias et al., 1996; Estes, Graham, and Mason, 1981; Lopez et al., 1985). The role of VP7 during the early interactions of the virus with the cell has not been

defined, but it has been proposed that it may modulate some functions of VP4 (Beisner et al., 1998; Mendez, Arias, and Lopez, 1996; Xu and Woode, 1994), and interact with cell surface molecules after the initial attachment of the virus through the VP4 protein (Coulson, Londrigan, and Lee, 1997; Mendez et al., 1999).

Recently, it has been established that the interaction of rotavirus with its host cell is a multistep process in which sequential contacts of the viral capsid with the cell surface take place (Mendez et al., 1999). Accordingly, different cellular molecules have been described as possible rotavirus receptors and co-receptors; among them gangliosides GM1 and GM3 (Delorme et al., 2001; Guo et al., 1999; Rolsma et al., 1998), and integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, and $\alpha v\beta 3$ (Coulson, Londrigan, and Lee, 1997; Guerrero et al., 2000b; Hewish, Takada, and Coulson, 2000), have been found to play an important role during virus binding and penetration to the cell.

The replication cycle and the structure of rotaviruses are strongly dependent on the concentration of the ion calcium in the environment (Gajardo et al., 1997; Ruiz, Cohen, and Michelangeli, 2000). During the replication cycle, the viral particles travel through different cellular compartments; each characterized by a different calcium concentration that is determinant for each step of the virus cycle. During cell entry, the triple-layered particle loses the outer layer proteins, VP4 and VP7, and the double-layered particle, active in transcription, reaches the cytoplasm. Although still

controversial, the low calcium-environment of the cell has been proposed to be needed for this uncoating process (Cuadras, Arias, and Lopez, 1997; Ludert et al., 1987). During virus assembly, the double-layered particle buds from the cytoplasm into the lumen of the ER, which has a high calcium environment, acquiring during the process a transient lipid envelope. The formation of mature virus, in which the transient envelope is replaced by the outer layer proteins VP4 and VP7 is strictly dependent on the concentration of calcium present in the ER lumen (Sharabari and Lee, 1987). Compounds that alter the concentration of this ion in the ER, such as tapsigargin, that depletes the calcium from the ER lumen, block the maturation of rotaviruses at the enveloped stage, and the mature triple layered particle is not formed (Poruchynsky, Maass, and Atkinson, 1991). Also, the synthesis of the viral proteins alters the calcium homeostasis of the cell, which favours the morphogenesis of the virus, and induces cell death (Dong et al., 1997).

The structure of the viral particle is also dependent on the calcium concentration. The outermost layer of rotavirus contains calcium (Sharabari and Lee, 1987). *In vitro*, when the viral particles are treated with calcium chelators, the virus uncoats, releasing the transcriptionally active double-layered particle (Cohen et al., 1979). The sensitivity of the viral particle to low concentrations of calcium segregates with VP7 (Gajardo et al., 1997), and more recently it has been shown that calcium binds within VP7 trimers, and that these calcium-stabilized trimers are the basic building block of the outer layer of the rotavirus

particle. Also, treatment of double layered particles with high concentrations of calcium (>1 M), cause the intermediate layer of the particle, formed by VP6, to disassemble (Lepault et al., 2001).

In this work we characterized the effect of increasing the calcium concentration in the cell culture medium on the infectivity of rotaviruses. We found that a 5-fold increase over the basal calcium concentration of the cell-culture medium, resulted in an increased viral titer in all rotavirus strains tested. The effect of this divalent ion was found to be mainly on the viral particle, and not on the molecules present on the surface of the cell. Analysis of the intrinsic fluorescence spectra of purified TLPs suggests that conformational changes in the viral particle might explain the effect of this ion on the enhancement of viral infectivity.

RESULTS

The infectivity of rhesus rotavirus RRV is increased by high concentrations of calcium. Since many steps of the viral cycle of rotaviruses are modulated by the concentration of calcium in the microenvironment, the effect of this ion on the infectivity of rhesus rotavirus RRV was tested. In this assay, MA104 cells were infected with RRV rotavirus suspended in Eagle's minimal medium (MEM) containing increasing concentrations of CaCl_2 , starting from 1.8 mM, which is the regular concentration of CaCl_2 in the MEM. The increase in calcium concentration in the medium during the incubation of the virus with the cells resulted in an enhancement of viral infectivity, reaching a maximum titer of virus at 14.4 mM CaCl_2 , which represented a four-fold increase in the infectivity as compared to the virus titer obtained in 1.8 mM CaCl_2 (Fig. 1). It was not possible to test higher concentrations of calcium in the medium since the viability of the MA104 cells was affected (data not shown). Based on these data, to characterize the effect of Ca^{2+} on the infectivity of rotaviruses, we used in the following assays 10 mM CaCl_2 as the highest concentration, and 2 mM CaCl_2 as the standard condition.

To analyse if the effect of calcium on the viral infectivity was specific of this ion, the effect of other divalent cations (Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} and Zn^{2+}) on rotavirus

infectivity was tested. We found that besides Ca^{2+} , the only other divalent ion that caused an increase in the infectivity of RRV was Sr^{2+} (Table I). This was not surprising, since in addition of having a ionic radius very similar to calcium, Sr^{2+} has been reported to share some functional features with calcium, like its binding to calmodulin (Missiaen et al., 1999; Yamamoto et al., 1987). Strontium has also been reported to be the only other divalent cation important for the stability of rotaviral particles (Shirley et al., 1981). Magnesium and barium did not have an effect on the viral titer at a concentration of 10 mM; at this same concentration, manganese and zinc were toxic to the cells; at 4 mM which was the highest concentration tolerated by the cells, these two ions did not affect the infectivity of the virus (not shown).

A high calcium concentration enhances the infectivity of several rotavirus strains. To study if the effect of the calcium ions was general for rotavirus strains isolated from different animal species, we infected MA104 cells with different rotavirus strains in medium containing either 2 mM or 10 mM CaCl_2 , and the titer of each virus was determined. Table II shows that the infectivity of all rotavirus strains tested increased in 10 mM Ca^{2+} , although the magnitude of the increment was different depending on the rotavirus strain, for example, the titer of the human strain DS1 increased about 50 fold over its control in 2 mM calcium, while the infectivity of the bovine strain NCDV only

increased by a factor of two; it is noteworthy that in general the viruses that had the lowest titers in the control medium, had the largest increments when their infectivity was assayed in medium containing 10 mM calcium.

To determine the specificity of this effect, the infectivity of two other non-enveloped viruses, poliovirus and reovirus, in 2 and 10 mM CaCl_2 was assayed. We found that the increase in the calcium concentration did not alter the infectious titer of any of these two viruses, indicating that the effect of calcium on the infectivity was specific for rotaviruses.

The effect of calcium is on the early interactions of rotavirus with the cell surface. To determine whether the calcium increase in the culture medium favoured the binding or the entry of rotavirus to the cell, we took advantage of the fact that rotaviruses attach to the cell at 4°C, but penetrate only at 37°C. In these assays, two-fold dilutions of trypsin-activated RRV virus, in MEM containing either 2 or 10 mM CaCl_2 , were adsorbed to monolayers of MA104 cells for 30 minutes at 4°C; the unbound virus was removed, and warm medium containing 10 or 2 mM CaCl_2 was added to the cells for 30 minutes at 37°C. After this incubation period the cells were washed, MEM containing 2 mM CaCl_2 was added and the infection was left to proceed for 14 hours at 37°C, time at which the cells were fixed and immunostained. Figure 2 shows that the viral infectivity increased only when 10 mM CaCl_2 was present during the adsorption period, but not when the

medium containing 10 mM calcium was added after the virus was bound in 2 mM calcium, suggesting that the effect of this ion could be during the binding step.

To characterize if the increase in viral titer at 10 mM calcium was due to an improved attachment of the viral particles to the cell surface, the amount of virus bound to the cells was determined. For this, purified TLPs in medium containing 2 or 10 mM CaCl_2 were incubated on monolayers of MA104 cells in 48 well-plates, for 1 hour at 4°C. After removing the unbound virus, the cells were washed extensively with MEM containing 2 mM calcium and then lysed by two rounds of freeze -thaw. The cell-bound virus present in the lysate, was determined by an ELISA, as previously described (Zarate et al., 2000), and its infectious titer was determined. We found no difference in the amount of viral particles bound to the cells in medium containing 2 or 10 mM CaCl_2 , as determined by the ELISA (Fig 3A). However, when the titer of these same preparations was analyzed, we found that the virus that was bound to the cells in 10 mM calcium had a titer 2 to 3 fold higher than the virus bound in 2 mM calcium (Fig. 3B). These results suggest that even though the same amount of physical particles bound to the cell surface in 2 or 10 mM calcium, the ratio of infectious to physical particles changed with the increased concentration of CaCl_2 used, probably because more viral particles were stabilised by the calcium to be able to penetrate and/or initiate the replication of the virus. These results suggest that the effect of the calcium is mainly on the viral particle,

although it can not be discarded that the calcium might be favouring or stabilising a specific virus-cell interaction, which finally leads to infection.

The effect of calcium on the infectivity of RRV is irreversible once the virus is bound to the cell surface. To determine if the effect of calcium on the viral particle was reversible, we performed the following experiments. CsCl-purified RRV TLPs, adjusted to either 2 or 10 mM CaCl₂ for 30 min at 4°C, were shifted for different periods of time to 10 or 2 mM CaCl₂, respectively, and the titer of the virus at these different time points after the change in calcium concentration, was determined (Fig 4A). We found that when the virus in 2 mM calcium was taken up to 10 mM, the viral infectivity increased almost immediately, since at the first time point measured (1 min) the titer of the virus was already seven fold higher than the control virus that was kept at 2 mM during the experiment. However, in the reverse experiment in which the virus resuspended in 10 mM calcium was diluted to 2 mM, we found that it took 90 minutes after the calcium concentration was reduced, for the titer of the virus to return to the level observed for the control virus that was kept at 2 mM calcium, suggesting that the effect of the increase in calcium concentration was primarily on the viral particle, and that this effect was reversible. In a second set of experiments the shift in calcium concentration was performed on virus that was already bound to the cells. In this case, two-fold dilutions of

CsCl purified TLPs in medium containing either 2 or 10 mM CaCl₂, were initially bound to a monolayer of MA104 cells for 30 minutes at 4°C, and then the medium was replaced for medium containing either 10 or 2 mM CaCl₂ for different periods of time at 4°C, which were stopped by replacing the MEM with warm MEM containing 2 mM CaCl₂. The infection was left to proceed for 14 h at 37°C, and the titer of these viruses was determined (Figure 4B). We found that, in contrast with the previous results, the titer of the virus that was initially bound at either concentration of calcium remained unchanged for the period of time tested, irrespective of the shift in calcium concentration. These results indicate that once the virus was bound to the cell surface, a decrease or an increase in calcium concentration no longer affected its interaction with the cell surface.

Calcium reduces the sialic acid dependence of RRV. RRV requires the presence of sialic acid on the cell surface to bind and to infect MA104 cells, and treatment of cells with neuraminidase (NA) diminishes drastically its infectivity (Méndez, Arias, and López, 1993). To study if the change in calcium concentration altered the initial interaction of RRV with sialic acid, MA104 cells treated with different concentrations of NA were infected with RRV, and its NA-resistant variant nar3 (Méndez, Arias, and López, 1993), in medium containing 2 or 10 mM CaCl₂. Figure 5 shows that, as previously observed, the infectivity of RRV in cells treated with 20 mU/ml

of NA decreased about 75%, while the infectivity of nar3 was not affected even at higher concentrations of NA. However, when this same assay was performed in the presence of 10 mM calcium the infectivity of RRV was less sensitive to the treatment of the cells with NA, so that at 20 mU of enzyme, the infectivity of this virus decreased only 15%. As expected, the infectivity of nar3 did not change in the NA-treated cells, even though the infection titer of this virus in MEM containing 10 mM CaCl₂ increased 10 fold with respect to the titer in 2 mM CaCl₂ (see table II). These results indicate that RRV in 10 mM calcium became less dependent on the presence of sialic acids on the cell surface, suggesting that the viral particles might have suffered a conformational change, such that the initial contact with the neuraminidase-sensitive receptor could be surpassed.

Fluorescence emission spectra of rotavirus RRV. Since we suspected that the increase in calcium concentration induced a conformational change in the viral particle that would allow the virus to better interact with the cell surface, we used fluorescence spectroscopy to detect possible conformational changes in the emission spectra of purified TLPs and DLPs of RRV, in either 2 or 10 mM calcium. The TLPs of RRV show a characteristic tryptophan fluorescence emission spectrum, with a peak at 328 nm. Addition of 10 mM CaCl₂ to this preparation showed a reproducible increase in the intrinsic fluorescence of the particles, but did not cause a shift in the emission spectrum

(Fig 6A). The inset shows the calcium concentration dependence of fluorescence of the TLPs, which is suggestive of a conformational change of the viral particle (Lakowicz, 1986). The increase in fluorescence was specific for the triple-layered particle, since the emission spectra of the DLPs did not change with the addition of 10 mM calcium (Fig. 6B), and the fluorescence intensity of the DLPs did not change with the addition of calcium (Fig. 6B-inset). The increase in fluorescence was specific for the ion calcium since when the fluorescence spectra of the TLPs was carried out using 10 mM $MgCl_2$, a shift in the fluorescence intensity of the viral particle was not detected (Fig. 6C), in agreement with the fact that magnesium did not have an effect on the viral titer. A solution of tryptophan, used as a control, did not change its fluorescence when 10 mM calcium was added (Fig. 6D). Addition of 10 mM calcium to purified TLPs of nar3 and Wa rotaviruses had the same effect on their emission spectra (data not shown). Taken together, these results suggest that the increase in the intrinsic fluorescence of the rotavirus TLPs might reflect a change in the exposure and/or environment of the tryptophan residues of the viral particle upon addition of calcium, which in turn might indicate a conformational change in the rotavirus TLPs. Since the fluorescence spectra of the DLPs did not vary under the different concentrations of calcium tested, the conformational changes induced by Ca^{2+} most likely occur in the proteins VP4 and VP7 that compose the outer layer of the virion.

Determination of the tryptophan residues exposed in rotavirus particles.

Aqueous fluorescence quenchers like KI, and acrylamide, measure the exposure of tryptophan residues to the aqueous environment. To determine if the change in the fluorescence spectra observed when the TLPs were incubated with 10 mM CaCl_2 was due to an increase in the tryptophan residues exposed to the solvent, fluorescence quenching studies using KI were carried out, and the degree of quenching was calculated by the modified Stern-Volmer equation (see Materials and Methods). Table III shows that there was a higher exposition of tryptophan residues when the TLPs of RRV and nar3 viruses were in 10 mM CaCl_2 , as compared to the TLPs in 2 mM calcium, indicating that the increase in calcium concentration induced a conformational change in the viral particles that resulted in a higher exposition of tryptophan residues to the aqueous environment.

DISCUSSION

There is a growing number of examples showing that for a virus to enter its host cell, it needs to establish several sequential interactions with cell receptors and coreceptors, and it has been shown that as a consequence of these interactions the viral particle may undergo conformational changes. These changes can be influenced by the presence of divalent ions, such as calcium. For example, this ion plays an important role in the stability of the viral capsids of SV40 (Liddington et al., 1991), black beetle nodavirus (Wery et al., 1994), polyoma virus (Haynes II, Deching, and Consigli, 1993), rhinovirus (Zhao et al., 1997), rotavirus (Cohen et al., 1979), and several plant viruses (Durham and Haidar, 1977; Durham and Hendry, 1977; Hull, 1978; Robinson and Harrison, 1982). It has also been observed that the binding of some viruses to their cellular receptors depend on the presence of calcium, like hepatitis A virus (Bishop and Anderson, 1997), and adenovirus type 37 (Wu et al., 2001). Calcium ions are also required for the cell fusion mediated by the interactions between CD4 and the HIV-1 envelope glycoproteins (Dimitrov et al., 1993; Doranz, Baik, and Doms, 1999; Jernigan, Blumenthal, and Puri, 2000).

The role of calcium on the stability of the rotaviral capsid was recognized shortly after the discovery of the virus (Cohen et al., 1979), and thereafter it has been observed

that many of the steps involved in the replication cycle of the virus depend on the calcium concentration of the microenvironment [reviewed in (Ruiz, Cohen, and Michelangeli, 2000)]. In this work, we characterized the effect of calcium on the infectivity of rotaviruses. We found that increases of this ion in the cell culture medium resulted in an enhanced infectivity of all rotavirus strains tested. This effect was found to be specific for rotaviruses since the infectivity of reovirus and poliovirus was not modified. We also found that the effect is specific for calcium (and strontium), since other divalent ions did not enhance the viral infectivity, suggesting that the increase in infectivity is due to the calcium ion *per se*, and not only due to the positive charges of this cation.

The results obtained in this work suggest that the effect of calcium is on the viral particle, since the infectivity was increased when the virus was either bound to cells or preincubated in suspension in 10 mM calcium; this enhancement of infectivity was maintained even if the calcium concentration was reduced to 2 mM after the virus was bound to the cells, or after the preincubation of the virus in suspension.

We found that even though the same amount of viral particles bound to the cell surface in both 2 and 10 mM calcium, as determined by an ELISA, the infectious titer of the particles bound to cells in 10 mM calcium was higher than that of the viral particles bound in 2 mM calcium. This observation suggests that when adsorbed to the cell surface in 10 mM calcium, more viral particles were competent to proceed with the infection. It is

known that of the total amount of virus produced as a result of an infection, there is a high proportion of viral particles that are non-infectious. In rotavirus the infectious to physical particle ratio is low, varying between different strains of rotavirus. For example, for rotavirus RRV it has been estimated that there is one infectious particle (IP) for every 100-300 physical, non-infectious particles (PP); and in the case of the human strain Wa this ratio is even lower, with one IP per $1-4 \times 10^4$ PP (Mendez et al., 1999). The reason why the physical particles are non-infectious is not known, but the fact that the infectious titer of a viral stock is enhanced in the presence of 10 mM calcium, suggests that this cation induces a change in the conformation of the viral capsid that makes the particles probably more stable, and able to initiate a productive infection. Recently, Dormitzer, et al (Dormitzer, Greenberg, and Harrison, 2000) reported that the trimerization of VP7 depends on the presence of calcium, and they suggested that dissociation of these trimers might be the biochemical basis for the EDTA-induced uncoating of rotavirus particles.

We have proposed that the entry of rotavirus to its host cell is a multistep process, in which the viral proteins interact with at least three different cellular molecules in a sequential manner (Mendez et al., 1999). We hypothesized that the virus could interact with these different molecules by experimenting conformational changes that allow the virion to expose the protein domains responsible for each of these interactions, although at present there has not been a direct observation of any of this putative conformational

changes in the viral particle. In this work, we found that rotavirus RRV which requires sialic acid to bind to and to infect cells, became less dependent at 10 mM calcium, on the presence of sialic acid on the surface of the cells. This observation suggests that incubation of the virus in this calcium concentration favours a conformational change in the RRV particle that allows the virus to interact with the cell surface, in a neuraminidase-resistant manner, surpassing the initial interaction of this virus with a sialic acid-containing receptor. The fact that other rotavirus strains, like nar3 which is a neuraminidase-resistant variant of RRV, and human strains Wa and DS1, which are naturally resistant to the neuraminidase treatment of the cells, also increased their titer upon addition of calcium, suggests that the favoured virus-cell interaction is shared among these strains. The precise virus-cell contact improved by the high calcium concentration needs to be defined.

In this work we used the intrinsic tryptophan fluorescence of purified TLPs to monitor the conformational changes of the viral particles induced by calcium. Tryptophan fluorescence is strongly influenced by the environment of its indole side chain, and has thus proved to be a useful tool to study conformational changes in proteins, protein-protein interactions, and protein-membrane interactions (Carneiro, Ferradosa, and Da Poian, 2001; Lakowicz, 1986)

The intrinsic fluorescence studies on the TLPs of RRV, nar3, and Wa (only shown for RRV), revealed that changes in the solvent exposure of the tryptophan residues occurred as calcium increased, which is an indication of a conformational change of the viral particle. The quenching assays with KI, further confirmed this observation, since it was determined that the percentage of tryptophan residues exposed in the nar3 and RRV TLPs in the presence of 10 mM calcium was higher than when the TLPs were suspended in 2 mM calcium.

Recently, it was suggested that the formation of the outer layer during viral assembly, and the loss of the outer layer during the entry of the virus into the cell, are mediated by a calcium-dependent conformational change in VP7 (Dormitzer, Greenberg, and Harrison, 2000). In this work we found that the calcium concentration induced conformational changes in the complete triple layered viral particle, which might be contributed in part by the changes that occur in VP7, although the contribution of VP4 can not be neglected.

Rotaviruses have a very specific cell tropism, infecting only the enterocytes on the tip of intestinal villi (Kapikian and Chanock, 1996). The digestive tract is exposed to a wide variation in the concentrations of calcium; in this regard, it is interesting to note that the young of the rotavirus-susceptible mammalian species are prone to develop the rotavirus disease, at an age where the principal component of the diet is milk, which

contains a mean calcium content of 10 mM (Mataloun and Leone, 2000; Meschy, 2000), thus providing an excellent microenvironment for the virus infection. From the practical point of view, the observations made in this work might prove to be useful, for the growth of those rotavirus strains that typically are fastidious to work with, given their low infectious titer in tissue culture.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses. MA 104 cells, L929 (L) cells, and HeLa cells were grown in Eagle's minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Throughout this work, the MEM employed for the calcium assays was initially prepared without calcium, and was supplemented with the indicated concentrations of CaCl_2 .

Rotavirus strains DS-1, 69M, Wa, ST3, B223, NCDV, RF, UK, MDR-13, YM, H2, L338, SA114S, RRV, nar3, TY-1 and CH-2; reovirus type 1 and poliovirus type 3, Leon strain, were obtained from different laboratories as indicated in Table II. All rotavirus strains were propagated in MA104 cells, in MEM containing 1.8 mM CaCl_2 (Espejo et al., 1980); poliovirus, and reovirus, were grown in HeLa, and L cells, respectively.

To prepare purified virus, virus-infected cells were harvested after complete cytopathic effect was attained, the cell lysate was frozen and thawed twice, and the virus was pelleted by centrifugation for 60 minutes at 25,000 rpm at 4°C in an SW28 rotor (Beckman). The virus pellet was resuspended in TNC buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 140 mM NaCl, 10 mM CaCl_2), extracted with Freon, and subjected to isopycnic centrifugation in cesium chloride gradients as previously described (Espejo, Lopez, and Arias, 1981). Double-layered particles (DLPs), were prepared by treatment of purified

triple layered particles (TLPs) with 50 mM EDTA for 30 min at 37°C, and then purified by equilibrium centrifugation in CsCl gradients as described previously. The opalescent band corresponding to DLPs was collected and rebanded in a second CsCl gradient. The protein composition of purified DLPs and TLPs was verified by SDS-PAGE, and their protein content were determined by the Bradford protein assay (Bio-Rad).

Infectivity assays. Confluent monolayers of MA104 cells in 96-well tissue culture plates were infected for 1 hour at 37°C with two-fold dilutions of trypsin-activated rotavirus (10 µg of trypsin per ml for 30 minutes at 37°C). After this time, the excess virus was removed; the cells were washed twice, and then incubated for 14h at 37°C in MEM. The virus-infected cells were determined by an immunoperoxidase focus assay, using a rabbit hyperimmune serum to porcine rotavirus YM, as previously described (Arias, Lizano, and López, 1987). This assay measures the expression of viral antigens during the first round of infection. The virus titer was expressed as focus forming units (ffu) per ml. The ffu's were counted with the help of a Visiolab semiautomatic system as described previously (Guerrero et al., 2000a).

For the infectivity assays in presence of different divalent ions, the MEM was supplemented with CaCl₂, MgCl₂, SrCl₂, BaCl₂, ZnCl₂ or MnCl₂ (Sigma Chemical Co.) to achieve a final concentration of 10 mM of each cation.

Neuraminidase treatment. MA 104 cells in 96-well plates were treated with different concentrations of neuraminidase (NA) from *Arthrobacter ureafaciens* (Sigma Chemical Co.) for 1 h at 37°C, as previously described (Méndez, Arias, and López, 1993). After two washes with MEM, the cells were infected with 1000 ffu's/ well of RRV or nar3 lysates, which were previously titrated in MEM containing either 2 or 10 mM CaCl₂, and processed as described above.

Binding Assays. Confluent monolayers of MA104 cells in 48 well plates were incubated with MEM containing 1% Bovine Serum Albumin (BSA) for 1 h at room temperature. Purified TLPs (500 ng/well) in ice-cold MEM-1% BSA with either 2 mM or 10 mM CaCl₂ in a final volume of 500 µl, were added to the cells for 1 h on ice with gentle shaking, and then the unbound virus was removed and the cells were washed three times with cold MEM. Finally, 120 µl of MEM were added to each well and the cells were subject to two rounds of freeze-thaw, and the lysed cells were stored at -70°C. The cell-bound virus present in these lysates was detected by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described previously (Zarate et al., 2000), and its viral titer was determined by an immunoperoxidase focus assay as described above.

Fluorescence measurements. Fluorescence spectra were obtained using a Perkin-Elmer luminescence spectrometer (Model LS-50B), at 25°C in 1 cm quartz cells (Perkin-Elmer) with a magnetic stirrer. Intrinsic fluorescence was measured exciting samples at

295 nm and collecting the emission between 300 and 400 nm, at 1500 nm/min. The intrinsic tryptophan fluorescence of purified viral particles (10 µg/ml) was measured in physiological solution (130 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM NaHCO₃, 0.5 mM NaHPO₄, 5 mM Hepes-Na, 5 mM glucose [pH 7.4]) (Santi et al., 1998), containing 2 mM or 10 mM CaCl₂. Fluorescence quenching studies were carried out by adding aliquots of freshly prepared 5 mM KI (Yang and Teng, 1998) to virus suspensions either in 2 mM or in 10 mM calcium. The degree of quenching was calculated by the modified Stern-Volmer equation (Lakowicz, 1986; Lehrer, 1971),

$$F_0 / (F_0 - F) = (1 / F_a) + ((1 / F_a K [Q]))$$

where F_0 and F are fluorescence intensities of the protein at an appropriate wavelength in the absence and presence of the quencher, respectively; F_a is the fraction of fluorescence groups accessible to the quencher; K is the Stern-Volmer quenching constant; and Q is the concentration of quencher. A plot of $F_0 / (F_0 - F)$ versus $1/[Q]$ will yield a straight line with a slope of $1/(F_a K)$ and intercept of $1/F_a$.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Rafaela Espinosa, and Pedro Romero for their excellent technical assistance. This work was partially supported by grants 75197-527106 and 55000613 from the Howard Hughes Medical Institute, G0012-N9607 from the National Council for Science and Technology-Mexico, and IN201399 from DGAPA-UNAM.

REFERENCES

- ARIAS, C. F., LIZANO, M., and LÓPEZ, S. (1987). Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J. Gen. Virol.* **68**, 633-642.
- ARIAS, C. F., ROMERO, P., ALVAREZ, V., and LÓPEZ, S. (1996). Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.* **70**(9), 5832-5839.
- BEISNER, B., KOOL, D., MARICH, A., and HOLMES, I. H. (1998). Characterisation of G serotype dependent non-antibody inhibitors of rotavirus in normal mouse serum. *Arch. Virol.* **143**(7), 1277-1294.
- BISHOP, N.E., and ANDERSON, D.A.(1997). Early interaction of hepatitis A with cultured cells:viral elution and the effect of pH and calcium ions. *Arch. Virol.* **142**, 2161-2178.
- CARNEIRO, F. A., FERRADOSA, A. S., and DA POIAN, A. T. (2001). Low pH-induced conformational changes in vesicular stomatitis virus glycoprotein involve dramatic structure reorganization. *J Biol Chem* **276**, 62-67.
- COHEN, J., LAPORTE, J., CHARPILLENNE, A., and SCHERER, R. (1979). Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch.Virol.* **60**, 177-182.
- COULSON, B. S., LONDRIGAN, S. L., and LEE, D. J. (1997). Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10), 5389-5394.
- CRAWFORD, S. E., LABBE, M., COHEN, J., BURROUGHS, M. H., ZHOU, Y. J., and ESTES, M. K. (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.* **68**(9), 5945-5952.

- CUADRAS, M. A., ARIAS, C. F., and LOPEZ, S. (1997). Rotaviruses induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca²⁺ concentration to initiate their replication cycle. *J Virol* **71**(12), 9065-9074.
- DELORME, C., BRUSSOW, H., SIDOTI, J., ROCHE, N., KARLSSON, K.-A., NEESER, J., and TENEBERG, S. (2001). Glycosphingolipid binding specificities of rotavirus: identification of a sialic acid-binding epitope. *J. Virol.* **75**(5), 2276-2287.
- DIMITROV, D., BRODER, C., BERGER, E., and BLUMENTHAL, R. (1993). Calcium ions required for cell fusion mediated by CD4-Human immunodeficiency Virus Type I envelope glycoprotein interaction. *J. Virol.* **67**(3), 1647-1652.
- DONG, Y., ZENG, C. Q. Y., BALL, J., ESTES, M. K., and MORRIS, A. (1997). The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 3960-3965.
- DORANZ, B. J., BAIK, S. S., and DOMS, R. W. (1999). Use of gp120 binding assay to dissect the requirements and kinetics of human immunodeficiency virus fusion events. *J. Virol.* **73**(12), 10346-10358.
- DORMITZER, P., GREENBERG, H., and HARRISON, S. C. (2000). Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers. *Virology* **277**, 420-428.
- DURHAM, A., and HAIDAR, M. (1977). Cation binding by tobacco rattle virus. *Virology* **77**, 520-523.
- DURHAM, A., and HENDRY, D. (1977). Cation binding by tobacco mosaic virus. *Virology* **77**, 510-519.
- ESPEJO, R., LOPEZ, S., and ARIAS, C. F. (1981). Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* **37**, 156-160.
- ESPEJO, R., MARTINEZ, E., LÓPEZ, S., and MUNOZ, O. (1980). Different polypeptide composition of two human rotavirus types. *Infect. Immun.* **28**, 230-237.

- ESTES, M. K. (1996). "Rotaviruses and their replication." In *Virology*, 3rd ed. (N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), Raven Press, New York, p 1625-1655
- ESTES, M. K., GRAHAM, D. Y., and MASON, B. B. (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol* **39**(3), 879-888.
- GAJARDO, R., VENDE, P., PONCET, D., and COHEN, J. (1997). Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein. *J Virol* **71**(3), 2211-2216.
- GUERRERO, C. A., MENDEZ, E., ZARATE, S., ISA, P., LOPEZ, S., and ARIAS, C. F. (2000b). Integrin mediates rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 14644-14649.
- GUERRERO, C. A., ZARATE, S., CORKIDI, G., LOPEZ, S., and ARIAS, C. F. (2000a). Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* **74**(20), 9362-9371.
- GUO, C., NAKAGOMI, O., MOCHIZUKI, M., ISHIDA, H., KISO, M., OHTA, Y., SUZUKI, T., MIYAMOTO, D., JWA HIDARI, K. I., and SUZUKI, Y. (1999). Ganglioside GM1a on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains1. *J. Biochem. (Tokyo)* **126**, 683-688.
- HAYNES II, J. I., DECHING, C., and CONSIGLI, R. A. (1993). Mutations in the putative calcium-binding domain of polyomavirus VP1 affect capsid assembly. *J Virol* **67**, 2486-2495.
- HEWISH, M. J., TAKADA, Y., and COULSON, B. S. (2000). Integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J. Virol* **74**(1), 228-236.
- HULL, R. (1978). The stabilization of the particles of turnip rosettevirus. III. Divalent cation. *Virology* **89**, 418-422.

- JERNIGAN, K., BLUMENTHAL, R., and PURI, A. (2000). Varyng effects of temperature, Ca²⁺ and cytochalasin on fusion activity mediated by immunodeficiency virus type 1 and type 2 glycoproteins. *FEBS Letters* **474**, 246-251.
- KAPIKIAN, A. Z., and CHANOCK, R. M. (1996). "Rotaviruses.". In: *Virology* 3rd ed.(N. Fields, D. N. Knipe, R. M. Howley, J. L. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus, Eds.), Raven Press, New York, p 1657-1708
- LAKOWICZ, J. R. (1986). "Principles of Fluorescence Spectroscopy." Third Ed. ed. Plenum Press, New York, USA.
- LEHRER, S. S. (1971). Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochem J* **10**, 3254-3263.
- LEPAULT, J., PETITPAS, I., ERK, I., NAVAZA, J., BIGOT, D., DONA, M., VACHETTE, P., COHEN, J., and REY, F. A. (2001). Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *Embo J.* **20**(7), 1498-1507.
- LIDDINGTON, R., YAN, Y., MOULAI, J., SAHLI, R., BENJAMIN, T., and HARRISON, S. (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution. *Nature* **354**, 278-284.
- LOPEZ, S., ARIAS, C. F., BELL, J. R., STRAUSS, J. H., and ESPEJO, R. T. (1985). Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* **144**, 11-19.
- LUDERT, J. E., FENG, N., YU, J. H., BROOME, R. L., HOSHINO, Y., and GREENBERG, H. B. (1996). Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. *J Virol* **70**(1), 487-93.
- LUDERT, J. E., MICHELANGELI, F., GIL, F., LIPRANDI, F., and ESPARZA, J. (1987). Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology* **27**(2), 95-101.

- MATALOUN, M. M., and LEONE, C. R. (2000). Human milk mineral intake and serum concentrations of calcium and phosphorus in newborn term infants: influence of a intrauterine growth restriction. *Acta Paediatr.* **89**, 1093-1097.
- MENDEZ, E., ARIAS, C. F., and LOPEZ, S. (1996). Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J Virol* **70**(2), 1218-1222.
- MÉNDEZ, E., ARIAS, C. F., and LÓPEZ, S. (1993). Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* **67**(9), 5253-5259.
- MENDEZ, E., LOPEZ, S., CUADRAS, M. A., ROMERO, P., and ARIAS, C. F. (1999). Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology* **263**, 450-459.
- MESCHY, F. (2000). Recent progress in the assessment of mineral requirements of goats. *Livestock Prod Sci* **64**, 9-14.
- MISSIAEN, L., PARYS, J., WEIDEMA, A., SIPMA, H., VANLINGEN, S., DE SMET, P., CALLEWAERT, G., and DE SMEDT, H. (1999). The bell-shaped Ca²⁺ dependence of the inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca²⁺ release is modulated by Ca²⁺/calmodulin. *J. Biol. Chem.* **274**(20), 13748-13751.
- PORUCHYNSKY, M., MAASS, D., and ATKINSON, P. (1991). Calcium depletion blocks the maturation of rotavirus by altering the oligomerization of virus-encoded proteins in the ER. *J.Cell.Biol.* **114**(4), 651-661.
- ROBINSON, I., and HARRISON, S. (1982). Structure of expanded state of tomato bushy stunt virus. *Nature (London)* **297**, 563-568.
- ROLSMA, M. D., KUHLENSCHMIDT, T. B., GELBERG, H. B., and KUHLENSCHMIDT, M. S. (1998). Structure and function of a ganglioside receptor for porcine rotavirus. *J Virol* **72**(11), 9079-9091.

- RUIZ, M. C., COHEN, J., and MICHELANGELI, F. (2000). Role of Ca^{+2} in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infectious. *Cell Calcium*(3), 137-149.
- SANTI, C. M., SANTOS, T., HERNANDEZ-CRUZ, A., and DARSZON, A. (1998). Properties of a novel pH-dependent Ca^{2+} permeation pathway present in male germ cells with possible roles in spermatogenesis and mature sperm function. *J.Gen.Physiol.* **112**(1), 33-53.
- SHARABARI, M. S., and LEE, P. W. (1987). Bovine rotavirus maturation is a calcium dependent process. *Virology* **158**, 103-111.
- SHIRLEY, J. A., BEARDS, G. M., THOULESS, M. E., and FLEWETT, T. H. (1981). The influence of divalent cations on the stability of human rotavirus. *Arch. Virol.* **67**, 1-9.
- WERY, J. P., REDDY, V. S., HOSUR, M. V., and JOHNSON, J. E. (1994). The refined three-dimensional structure of an insect virus at 2.8Å resolution. *J Mol Biol* **235**, 565-586.
- WU, E., FERNANDEZ, J., FLECK, S., VON SEGGERN, D., HUANG, S., and NEMEROW, G. (2001). A 50-kDa Membrane Protein Mediates Sialic Acid-Independent Binding and Infection of Conjunctival Cells by Adenovirus Type 37. *Virology* **279**(1), 78-89.
- XU, Z., and WOODE, G. (1994). Studies on the influence of the VP7 gene on rotavirus replication. *Virology* **198**(1), 394-398.
- YAMAMOTO, K., NAKAYAMA, H., NUNOI, K., and JFUJISHIMA, M. (1987). Interaction of calmodulin I and the troponin-tropomyosin-actin complex Effect of Ca^{+} and Sr^{+} ions. *Biochem J* **241**, 905-909.
- YANG, Y.-W., and TENG, C.-C. (1998). Circular dichroism and fluorescence studies of polyomavirus major capsid protein VP1. *J. Prot. Chem.* **17**(1), 61-71.

ZARATE, S., ESPINOSA, R., ROMERO, P., MENDEZ, E., ARIAS, C.F. and LOPEZ, S.(2000).

The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J Virol* **74**, 593-599.

ZHAO, R., HADFIELD, A. T., KREMER, M. J., and ROSSMANN, M. G. (1997). Cations in human rhinoviruses. *Virology* **227**, 13-23.

Table I. Effect of different divalent ions on the infectivity of RRV rotavirus

Divalent ion	Infectivity*
BaCl ₂	0.95 ±0.04
CaCl ₂	5.65 ±0.21
SrCl ₂	3.70 ±0.56
MgCl ₂	0.85 ±0.07

* Expressed as fold increase over control (viral infectivity in 2 mM CaCl₂). The arithmetic mean +/- standard deviation of three independent experiments, performed in duplicate is shown.

Table II. Effect of calcium on the infectivity of different rotavirus strains

Virus	origin	Virus titer* in		fold increase [§]
		2 mM CaCl ₂	10 mM CaCl ₂	
DS-1 ^a	Hu	6.2x10 ⁴	3.5x10 ⁶	56.5 ± 19.0
ST3 ^b	Hu	2.1x10 ⁴	8.7x10 ⁵	41.3 ± 16.0
TY-1 ^a	Av	3.5x10 ⁵	6.6x10 ⁶	18.9 ± 5.0
CH-2 ^a	Av	5.2x10 ⁵	7.0x10 ⁶	13.5 ± 0.2
nar3 ^c	Si	6.7x10 ⁵	7.0x10 ⁶	10.4 ± 1.1
Wa ^d	Hu	3.9x10 ⁶	2.9x10 ⁷	7.4 ± 0.3
UK ^b	Bo	1.2x10 ⁶	8.5x10 ⁶	7.1 ± 0.2
L338 ^b	Eq	9.4x10 ⁶	5.8x10 ⁷	6.2 ± 3.1
B223 ^a	Bo	5.7x10 ⁵	2.7x10 ⁶	4.8 ± 0.1
RF ^e	Bo	4.0x10 ⁶	1.8x10 ⁷	4.7 ± 0.4
YM ^c	Po	3.9x10 ⁶	1.7x10 ⁷	4.3 ± 0.5
H2 ^b	Eq	1.4x10 ⁶	5.6x10 ⁶	4.0 ± 1.7
69M ^f	Hu	5.8x10 ⁶	2.0x10 ⁷	3.4 ± 0.3
RRV ^d	Si	1.1x10 ⁷	5.0x10 ⁷	4.8 ± 1.3
SA11 4S ^g	Si	4.3x10 ⁷	1.1x10 ⁸	2.5 ± 0.2
NCDV ^b	Bo	6.9x10 ⁷	1.6x10 ⁸	2.3 ± 0.6
Poliovirus ^h	Hu	4.0x10 ⁴	4.0x10 ⁴	1.0 ± 0.2
Reovirus ⁱ	Hu	2.7x10 ⁵	3.0x10 ⁵	1.1 ± 0.2

* The arithmetic mean of at least three independent experiments performed in duplicate is shown. [§] Fold increase over control (infectivity in 2 mM CaCl₂). The arithmetic mean +/- standard deviation of at least three independent experiments is shown. ^a Y. Hoshino, National Institutes of Health, Bethesda, MD. USA; ^b D.R. Snodgrass, Morendun Research Institute, Edinburgh, U. K.; ^c This lab, IBT-UNAM. Mex; ^d H.B. Greenberg, Stanford University, Palo Alto, CA, USA; ^e J. Cohen, Institut National de la Recherche Agronomique, Cedex, France; ^f G.N. Woode, College of Veterinary Medicine. Texas A&M University. USA; ^g M.K. Estes, Baylor College of Medicine, Houston, Texas. USA. ^h R. M. del Angel, CINVESTAV-IPN, Mex. ⁱ C. Ramos, CISEI, Instituto Nacional de Salud Pública, Mex.

Table III. Determination of tryptophan residues exposed in rotavirus particles*

Virus	2 mM CaCl₂	10 mM CaCl₂
RRV	35.5% ± 2.18	45.77%±4.21
nar3	22.43% ±0.96	39.88% ± 2.31

*Data are expressed as the percentage of tryptophan residues exposed in the viral particles at indicated calcium concentration. These results represent the arithmetic mean +/- standard deviation of three independent experiments.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1.- Effect of calcium concentration on the infectivity of rotavirus RRV. MA104 cells in 96-well plates were infected with trypsin-activated virus in MEM containing the indicated calcium concentrations. After 1 h of adsorption at 37°C, the virus inoculum was removed and fresh MEM (1.8 mM CaCl₂) was added. The infected cells were incubated for 14 h at 37°C; after this time, the cells were fixed and stained by an immunoperoxidase assay as described under Material and Methods. Data are expressed as fold increases over control (virus titer in 1.8 mM CaCl₂ = 2x10⁷ ffu's/ml). The arithmetic mean +/- standard deviation of three independent experiments performed in duplicate is shown.

Fig. 2.- Effect of calcium concentration on the early interactions of rotavirus with the host cells. Trypsin-activated virus in MEM containing either 2 mM or 10 mM CaCl₂, was adsorbed to a confluent monolayer of MA104 cells for 30 min at 4°C. After this time the unbound virus was removed and warm MEM containing 10 mM or 2 mM CaCl₂ was added to the cells for 30 min at 37°C. The cells were washed twice and the infection was left to proceed in MEM containing 2 mM calcium for 14h at 37°C; time at which the cells were fixed and stained by an immunoperoxidase assay as described under Material and Methods. Data are expressed as fold increases over control (virus titer in 2 mM CaCl₂ =

1.8x10⁶ ffu's/ml). The arithmetic mean +/- standard deviation of three independent experiments, performed in duplicate is shown.

Fig. 3.- Effect of calcium concentration on the binding of RRV TLPs to the surface of MA104 cells. Confluent monolayers of MA104 cells in 48 well plates were pre-incubated with MEM-1% BSA for 1 h at room temperature. Ice-cold purified TLPs (500 ng/well) suspended in MEM-1% BSA containing 2 mM or 10 mM CaCl₂ were added to the cells for 1 h at 4°C, with gentle shaking. Cells were washed, MEM with 2 mM calcium was added and the cells were lysed by two rounds of freeze-thaw. A) The cell-bound virus, present in these lysates was quantified by an ELISA as described under Material and Methods. B) The viral titer in these lysates was determined by an immunoperoxidase focus assay, as described under Material and Methods. Data are expressed as fold increases over control (A) (OD at 405 nm of the virus bound in 2 mM CaCl₂) or (B) (titer of the virus bound in 2 mM CaCl₂ = 0.9x10⁶ ffu's/ml). The arithmetic mean +/- standard deviation of three independent experiments, performed in duplicate is shown

Fig. 4. - Effect of calcium concentration changes on the viral particles in suspension, or bound to the cells. A) Two fold dilutions of trypsin-activated purified TLPs of RRV

in suspension were diluted in MEM with 2 mM or 10 mM CaCl₂ and kept for 30 min at 4°C, the virus was then taken up to a concentration of 10 mM calcium or diluted to 2 mM CaCl₂ respectively, and at the indicated time points, the virus was adsorbed to the cells for 30 min at 4°C, and then warm MEM containing 2 mM calcium was added and the infection was left to proceed for 14 h and processed as described under Material and Methods. B) Two-fold dilutions of trypsin-activated purified TLPs of RRV were adsorbed to confluent monolayers of MA104 cells in MEM containing 2 mM or 10 mM CaCl₂ for 30 min at 4°C. After this time, the unbound virus was removed and the calcium concentration in the medium was shifted to 10 mM or 2 mM CaCl₂ respectively, and at the indicated time points at 4°C the cells were washed, warm MEM containing 2 mM calcium was added, and the infection was left to proceed for 14 h. The cells were fixed and stained by an immunoperoxidase assay as indicated under Material and Methods. Data are expressed as fold increases over control (viral infectivity in 2 mM CaCl₂ = 2.5×10^7 ffu's/ml or viral infectivity in 10 mM CaCl₂) = 1.8×10^8 ffu's/ml). The arithmetic mean +/- standard deviation of three independent experiments, performed in duplicate is shown.

Fig. 5.- Effect of calcium concentration on the infectivity of rotavirus in

neuraminidase treated cells. MA104 cells in 96 well-plates were treated with the

indicated concentrations of NA from *A. ureafaciens* for 1 h at 37°C, washed and subsequently infected with 1000 ffu's/well of trypsin-activated rotaviruses RRV or nar3, in MEM containing 2 mM or 10 mM CaCl₂ for 1 h at 37°C. The virus inoculum was removed and fresh MEM with 2 mM calcium was added, and the infection was left to proceed for 14 h at 37°C. The cells were fixed and stained by an immunoperoxidase assay as described under Material and Methods. Data are expressed as percentage of infectivity in control, untreated cells in 2 mM CaCl₂ or 10 mM CaCl₂. The arithmetic mean +/- standard deviation of three independent experiments performed in duplicate is shown.

Fig. 6.- Fluorescence emission spectra from rotavirus particles. A) Samples of purified TLPs of rotavirus RRV (10 µg/ml) in physiological solution containing 2 mM CaCl₂ (dotted line) or after addition of calcium to a final concentration of 10 mM (continuous line). B) Fluorescence spectra of RRV-DLPs (10 µg/ml) in physiological solution containing 2 mM (dotted line) or 10 mM CaCl₂ (continuous line). The insets in A and B show the fluorescence intensity of the TLPs or DLPs at 328 nm at increasing calcium concentrations. C) TLPs of rotavirus RRV (10 µg/ml) in physiological solution containing 2 mM CaCl₂ (dotted line) or after addition of MgCl₂ to a final concentration of 10 mM (continuous line). D) Tryptophan (10 ng/ml) in physiological solution with 2 mM (dotted line) or 10 mM CaCl₂ (continuous line). The excitation wavelength was 295 nm.

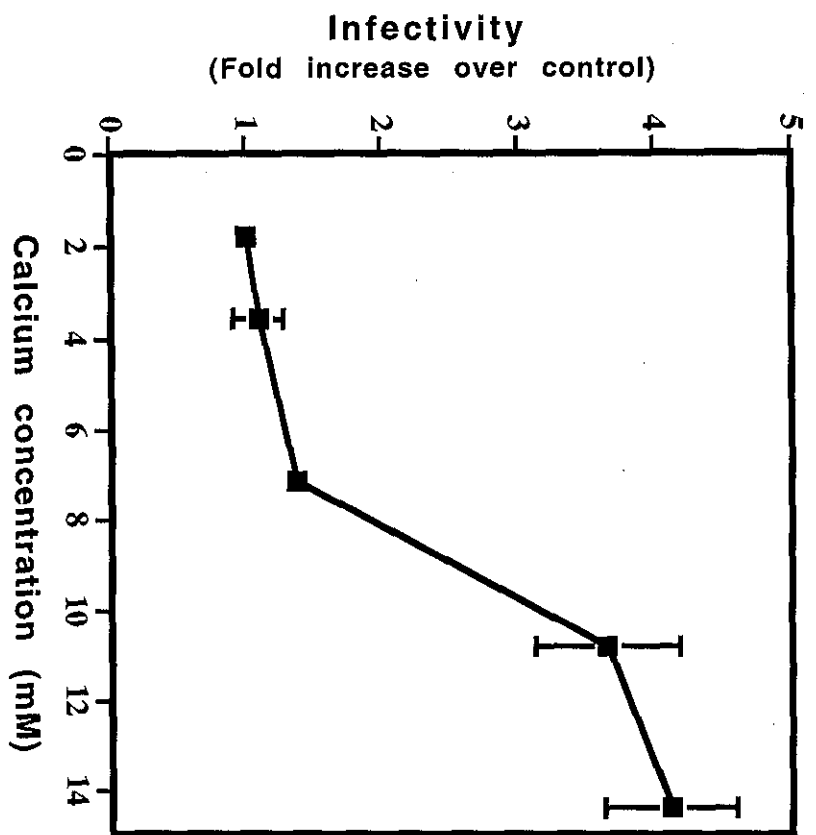


Figure 1

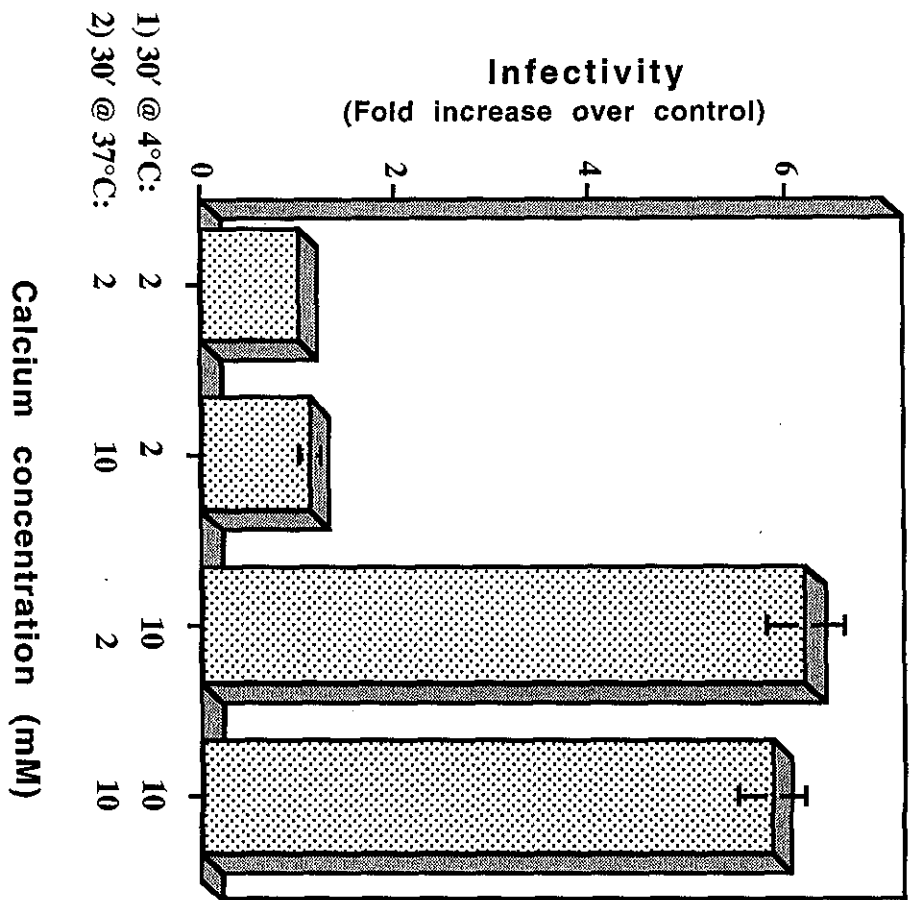


Figure 2

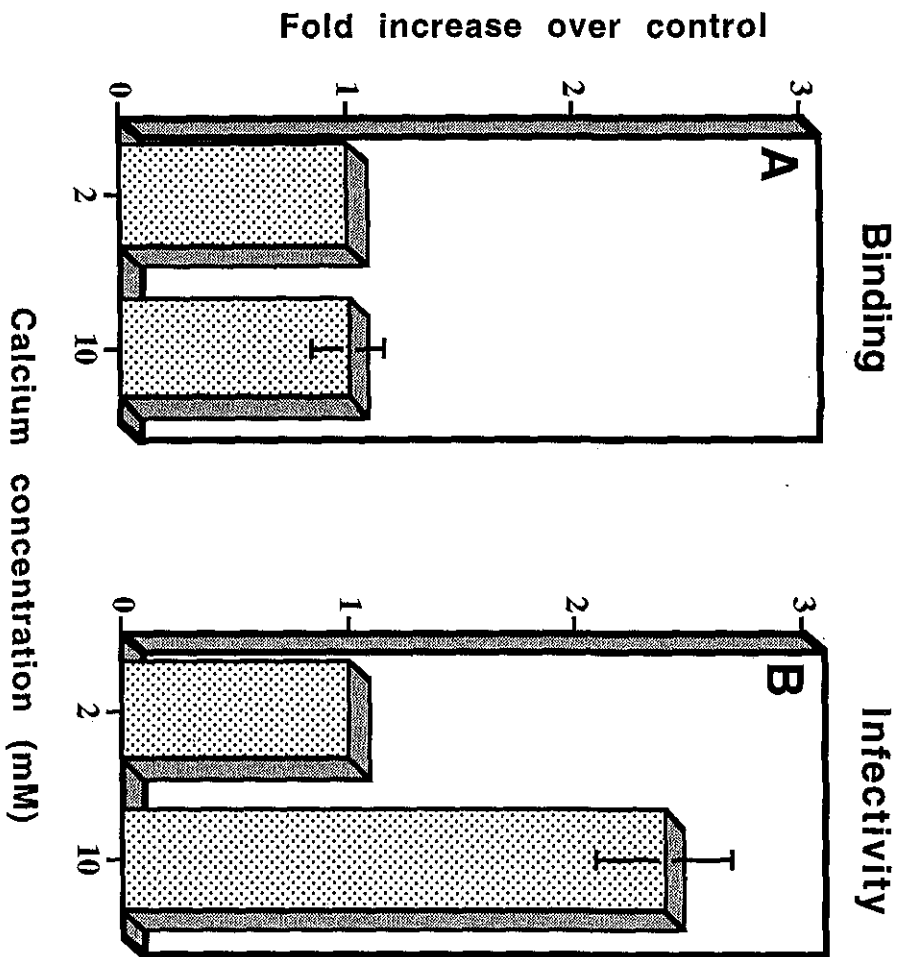


Figure 3

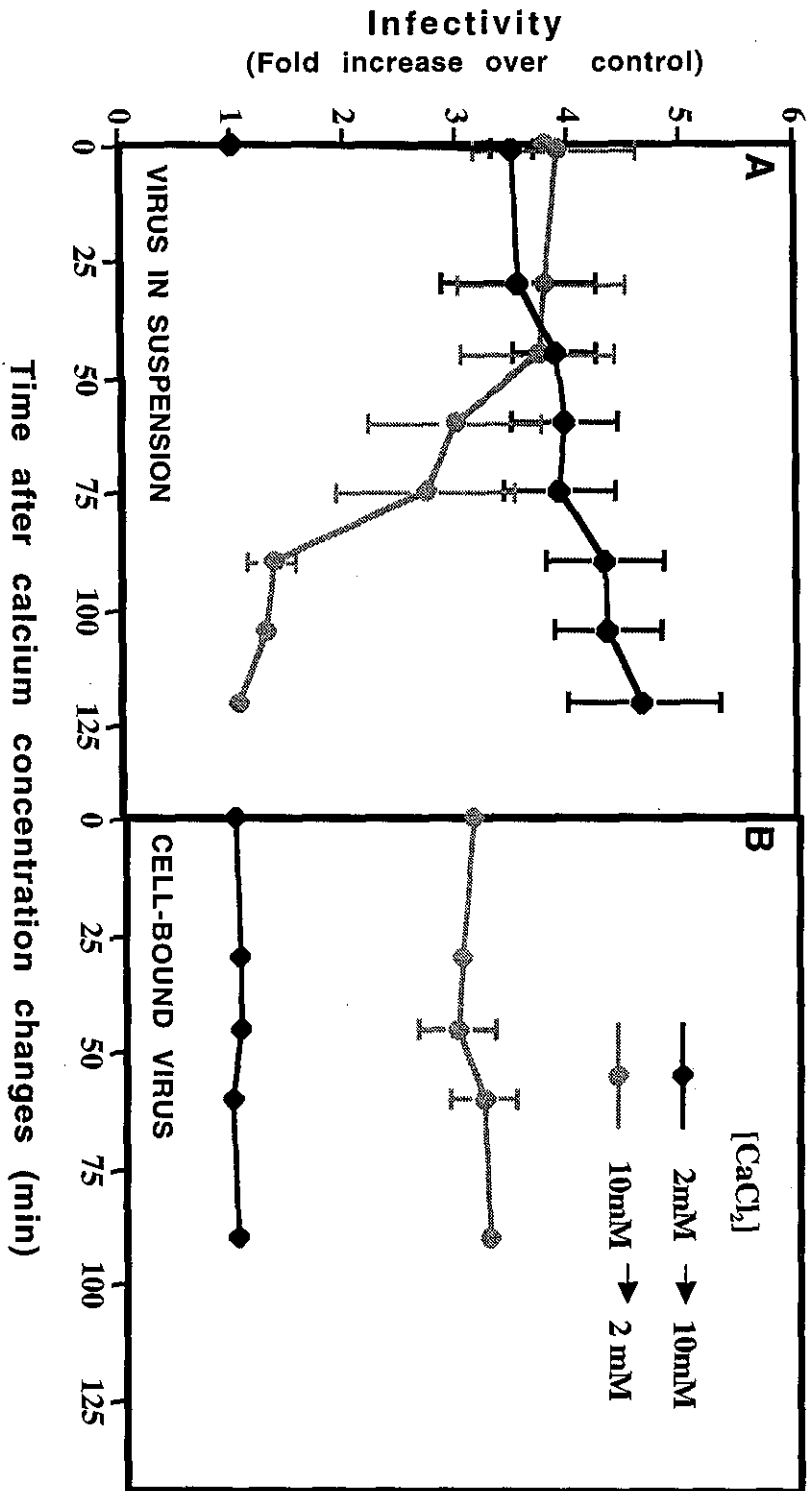


Figure 4

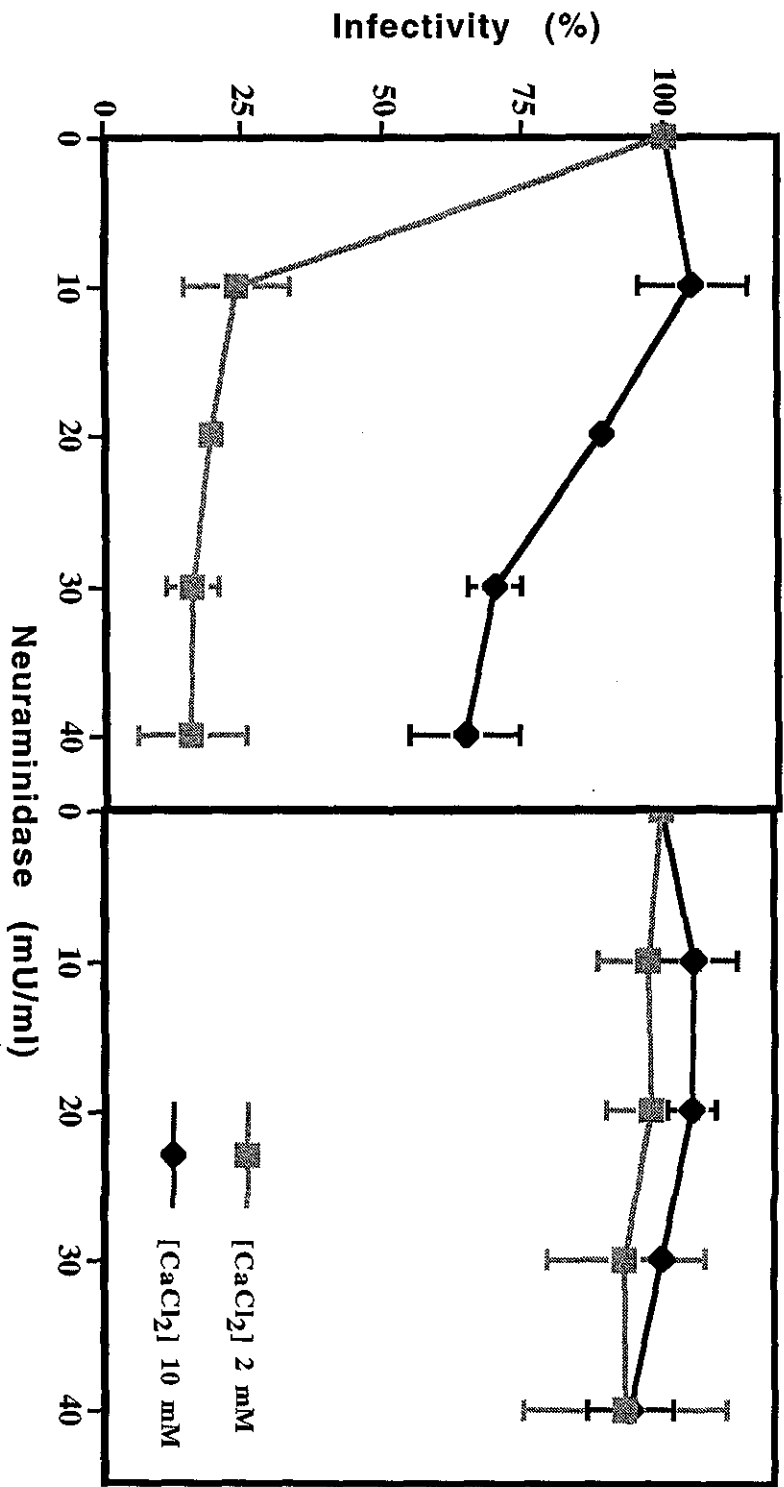


Figure 5

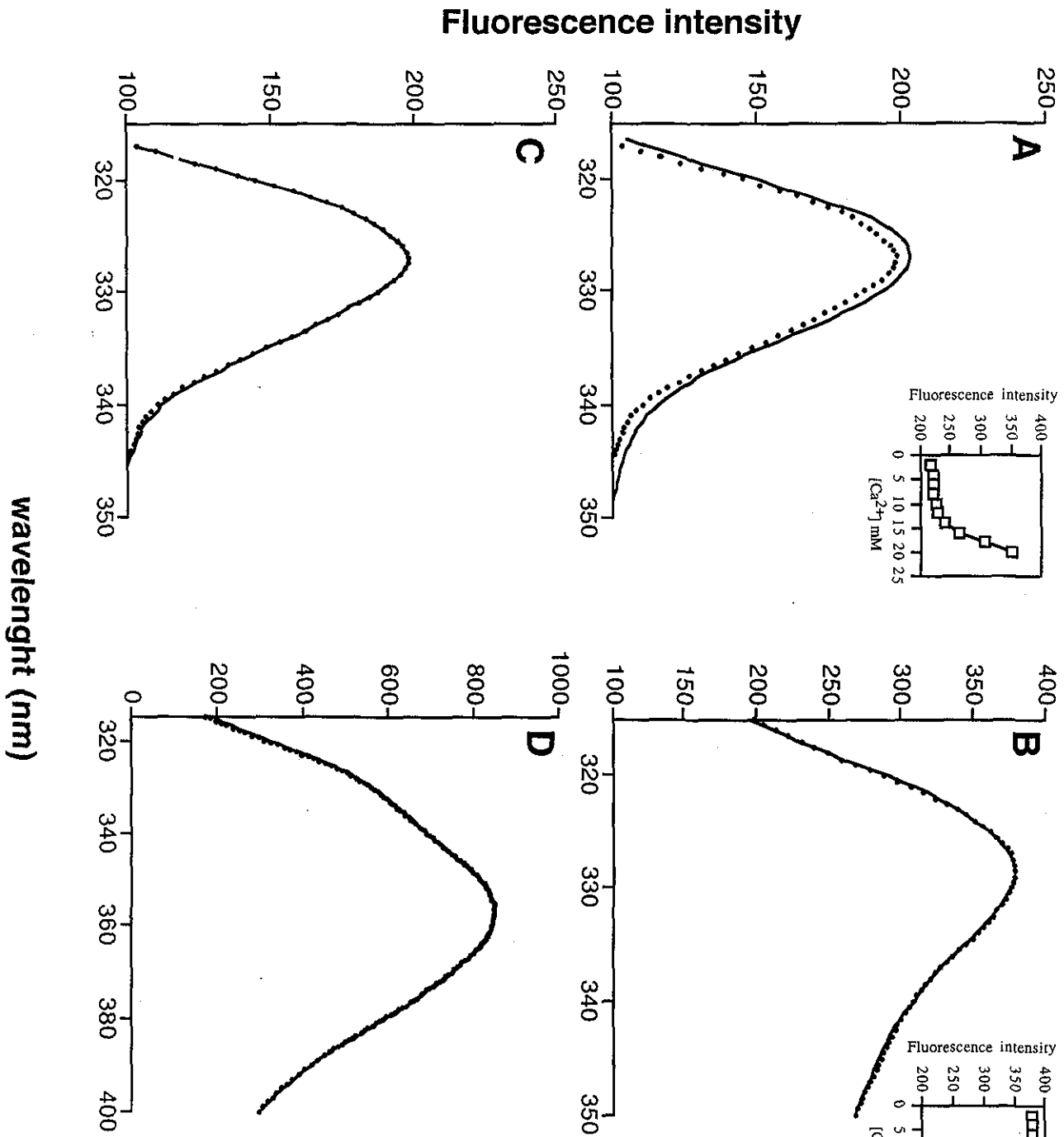


Figure 6



**Fundación
GlaxoWellcome**

Otorga el presente

DIPLOMA

al trabajo científico titulado:

**"LA INFECTIVIDAD DE LOS ROTAVIRUS
ES MODULADA POR EL CALCIO"**

Desarrollado por los Investigadores

Dra. Susana López Charretón

M.en C. Rosa Victoria Pando

Dr. Pavel Isa

Dr. Carlos Federico Arias

POR HABER OBTENIDO EL

TERCER LUGAR

DENTRO DEL AREA DE INVESTIGACION BÁSICA
EN EL XII PREMIO NACIONAL DE

INVESTIGACION FUNDACION GLAXO WELLCOME 2000

XAVIER REYES PONCE
Presidente

DR. JORGE TANAKA KIDO
Presidente Ejecutivo

LA INFECTIVIDAD DE LOS ROTAVIRUS ES MEDIADA POR EL CALCIO

RESUMEN

Los rotavirus son el principal agente etiológico de gastroenteritis severas en niños menores de años de edad. El tropismo de estos virus es muy específico ya que sólo infectan las células que se encuentran en las puntas de las vellosidades del intestino delgado. A diferencia de los rotavirus aislados de animales, la caracterización bioquímica y molecular de los rotavirus de origen humano se ha visto limitada por lo difícil que ha resultado propagar éste tipo de virus en cultivos celulares. En este trabajo reportamos que la infectividad de los rotavirus es dependiente de la concentración de calcio durante las etapas iniciales de la infección. La caracterización de este fenómeno, el cuál no ha sido descrito previamente, sugiere que la concentración de calcio en el medio induce un cambio conformacional en la partícula viral que la estabiliza y que favorece una interacción virus-celula más eficiente, con el consecuente aumento de la infectividad del virus. El incremento de la infectividad viral dependiente de la concentración de calcio, se observó para todas las cepas de rotavirus que se ensayaron, independientemente del origen del huésped animal del que se aislaron. Este hallazgo es relevante, ya que provee una herramienta metodológica que facilitará el estudio de las cepas de rotavirus aisladas de humanos, lo cual contribuirá al desarrollo nacional de medidas de control contra estos virus.

INTRODUCCIÓN

Las gastroenteritis infecciosas agudas son la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años en los países en desarrollo, con alrededor de mil millones de episodios diarréicos y entre cuatro y cinco millones de muertes por año. Los rotavirus son la causa principal de las diarreas deshidratantes severas en niños menores de dos años, y se ha estimado que una vacuna efectiva contra estos virus podría evitar cerca de 800,000 muertes de infantes cada año (12, 19). Es importante hacer notar que aunque la mortalidad debida a las infecciones por rotavirus es mucho mayor en países en desarrollo que en países desarrollados, la frecuencia de infección es muy similar en ambos tipos de países. Debido al papel tan importante que tienen los rotavirus en las enfermedades diarréicas infantiles, y al hecho de que aún niveles de higiene avanzados parecen no ser capaces de controlar significativamente las infecciones por estos virus, existe un interés considerable en desarrollar estrategias de vacunación que sean eficaces para controlar la severidad de la diarrea causada por estos virus (5, 19).

La infección por rotavirus es muy común, se ha observado que a la edad de 5 años, el 95% de los niños ya han sido infectados. El pico de incidencia de la enfermedad está entre los 6 y los 24 meses de edad, siendo ésta, la población con más alto riesgo de sufrir una diarrea severa, que requiera de hospitalización. La infección en adultos es por lo regular asintomática, aunque ocasionalmente se presentan síntomas en pacientes inmunocomprometidos y en adultos de la tercera edad. La diarrea por rotavirus ocurre principalmente durante los meses de invierno en los países con clima templado; esta estacionalidad es menos marcada en los países con clima tropical (7).

Los rotavirus en humanos fueron inicialmente descritos en 1973 (3), desde entonces, estos virus han sido reconocidos como el principal agente etiológico de las gastroenteritis virales en infantes, así como en las crías de un gran número de mamíferos

y aves (13). La mayoría de los estudios bioquímicos y genéticos de estos virus se han realizado en cepas de rotavirus aisladas de especies animales, ya que los rotavirus aislados de humano han resultado difíciles de adaptar al cultivo de tejidos y el rendimiento viral que se obtiene es relativamente bajo, lo que ha dificultado su caracterización.

Estos virus, miembros de la familia Reoviridae, están compuestos por tres capas concéntricas de proteína que rodean al genoma viral, formado por once segmentos de RNA de doble cadena. La capa más externa está formada por dos proteínas, VP4 y VP7. La superficie del virus está compuesta por 780 copias de la glicoproteína VP7, organizada en forma de trímeros, mientras que 60 espículas, formadas por dímeros de VP4, se proyectan hacia el exterior de la superficie viral (12). Estas dos proteínas son las responsables de las primeras interacciones del rotavirus con su célula huésped y constituyen los mayores blancos antigénicos para neutralización del virus, por lo que son consideradas de gran importancia en el desarrollo de vacunas (5).

In vivo, los rotavirus tienen un tropismo celular sumamente específico; la replicación viral sólo se lleva a cabo en los enterocitos diferenciados de las vellosidades del intestino delgado (4). *In vitro*, los rotavirus también presentan esta característica, ya que sólo infectan líneas celulares de origen renal o intestinal (13), lo que sugiere la existencia de receptores específicos en las células susceptibles(19). La entrada de los rotavirus al citoplasma de las células es un proceso que involucra múltiples pasos, donde se llevan a cabo distintas interacciones entre la proteína de la capa externa del virus, VP4 y probablemente VP7, con diferentes moléculas en la superficie de la célula (24). Se han reportado distintas moléculas celulares que interaccionan con el virus durante la unión e ingreso de éste a la célula. Estas moléculas son: los gangliósidos GM1 (18) y GM3 (25), y las integrinas del tipo $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_x\beta_2$, (8) y $\alpha_v\beta_3$ (16). Sin embargo, aún no es clara la función que cumple cada una de éstas moléculas durante el proceso de infección del

virus. Durante varias etapas del ciclo replicativo de los rotavirus el ion calcio juega un papel preponderante. Eventos tales como la estabilidad de la partícula viral, la activación de la transcripción, la morfogénesis de la partícula viral y la lisis celular producto de la infección por rotavirus, dependen de las concentraciones relativas de este ion en los diferentes compartimentos celulares; así, por ejemplo, el proceso de maduración de los rotavirus depende de la concentración de calcio en lumen del retículo endoplásmico (28). El ion calcio es responsable de la estabilidad de la partícula viral, ya que tratamientos del virus con agentes quelantes de este ion, como el EGTA, provocan que las proteínas de la capa externa (VP4 y VP7) se desprendan del virus, dando lugar a partículas con dos capas proteicas que no son infecciosas (6).

En este trabajo se encontró que la infectividad de los rotavirus es dependiente de la concentración de calcio durante las etapas iniciales de la infección. La caracterización de este fenómeno, el cual no ha sido descrito anteriormente, nos ha permitido proponer que la concentración de calcio en el medio puede inducir un cambio conformacional en la partícula viral que la estabiliza y que favorece una interacción virus-célula más eficiente, con el consecuente aumento de la infectividad del virus. Se encontró que este incremento de la infectividad viral, dependiente de la concentración de calcio, es general para todas las cepas de rotavirus que se ensayaron, independientemente del origen del huésped animal del que se aislaron. Este hallazgo es relevante, ya que provee de una herramienta metodológica que facilitará el estudio de las cepas de rotavirus aisladas de humanos, las cuales, como se mencionó anteriormente, no han podido caracterizarse en detalle, debido a la dificultad para propagarlas en cultivo de células.

MATERIAL Y MÉTODOS

Células y virus. En este trabajo se utilizó la línea celular MA104 (proveniente de células epiteliales de riñón de mono). Las células se crecieron en el Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) (GibcoBRL), suplementado con 10% de suero bovino fetal, a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Se utilizaron las siguientes cepas de rotavirus: DS-1, 69M, Wa, ST3, B223, NCDV, RF, UK, MDR-13, YM, H2, L338, SA11 4S, RRV, Nar3, TY-1 y CH-2. También se utilizaron poliovirus tipo 3 (cepa León) y reovirus tipo 1. El origen de estas cepas se indica en la Tabla 2.

El rotavirus RRV se purificó en gradientes isopícnicos de CsCl₂, siguiendo el protocolo previamente descrito (33). El contenido de proteínas de las partículas virales se cuantificó mediante el ensayo de Bradford (Bio-rad).

Ensayos de infectividad. Monocapas confluentes de células MA104, crecidas en placas de 96 pozos, se infectaron durante 1 hora a 37°C, con una cantidad conocida de virus previamente activado con tripsina (10 µg/ml durante 30 minutos a 37°C). Posteriormente se retiró el exceso de virus, las células se lavaron dos veces con medio de cultivo y se incubaron durante 14 horas a 37°C en MEM sin suero. Después de este tiempo de incubación, las células se fijaron y se inmunotñieron siguiendo el protocolo descrito por Arias et al. (1). El número de células infectadas se cuantificó empleando un sistema semiautomático (17).

Para los ensayos de infectividad en presencia de distintos iones divalentes, el MEM se suplementó con una concentración final de 10 mM de las siguientes sales: MgCl₂, SrCl₂, BaCl₂, ZnCl₂ y MnCl₂ (Sigma Chemical Co).

Tratamiento de las células con neuraminidasa. Monocapas confluentes de células MA104 en placas de 96 pozos se trataron con diferentes concentraciones de neuraminidasa de *A. ureafaciens* (Sigma Chemical Co), diluida en MEM sin suero, durante 1 hora a 37°C (23). Después de esta incubación, las células se lavaron dos veces con medio de cultivo y posteriormente se infectaron con los virus RRV y nar3 en presencia 2 mM y 10 mM de calcio, y el experimento se continuó como se describe en el ensayo de infectividad.

Ensayo de unión. Este ensayo se realiza sobre monocapas confluentes de células MA104 crecidas en placas de 24 pozos, siguiendo el método descrito por Londrigan et al. (22). En resumen, las células se incubaron con 1% BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se lavaron con MEM y se añadió virus RRV purificado (500 ng/pozo) suspendido en MEM 1% BSA conteniendo 2 mM ó 10 mM de calcio. El virus se adsorbió sobre las células durante 1 hora a 4°C, con agitación suave. Posteriormente las células se lavaron 2 veces con medio de cultivo a 4°C para retirar el exceso de virus y finalmente, se añadió MEM sin suero a cada pozo y las células se congelaron y descongelaron 2 veces para lisarlas. Las partículas virales unidas a las células, presentes en los lisados resultantes, se cuantificaron por un ensayo de ELISA específico para rotavirus (33).

Mediciones de fluorescencia. Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro de luminiscencia, Modelo LS-50 (Perkin Elmer). Se colectaron los datos de un barrido de la emisión de fluorescencia entre 300 y 400 nm a 1500 nm/min. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm, con un ancho de banda de 10 nm en ambos monocromadores, de excitación y de emisión. La fluorescencia intrínseca de los triptofanos de las partículas virales purificadas (10 µg/ml) suspendidas en solución fisiológica (130 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1 mM NaHCO₃, 0.5 mM NaHPO₄, 5 mM HEPES-Na, 5 mM glucosa, [pH 7.4]) (27), se midió a 25°C, en una

cubeta de 1 cm de diámetro con agitación magnética suave. Los resultados que se presentan son el promedio de 3 mediciones de la intensidad de la fluorescencia en la misma muestra.

Los estudios de apagamiento de la fluorescencia con ioduro de potasio (KI), se realizaron en una suspensión de virus en solución fisiológica, conteniendo 2 mM ó 10 mM de CaCl₂, a la que se agregó por goteo una solución de 50 mM de KI, como ha sido descrito previamente (32). La longitud de onda de excitación fue 295 nm y se colectaron los datos de emisión de la fluorescencia a 328 nm. El grado de apagamiento de la fluorescencia se calculó según la ecuación modificada de Stern-Volmer (20, 21): $F_0/(F_0 - F) = (1/F_a) + (1/(F_a K[Q]))$; donde F_0 y F son la intensidad de la fluorescencia de la proteína en la longitud de onda apropiada, en presencia y en ausencia del agente que abate la fluorescencia (KI), respectivamente; F_a es la fracción de grupos fluorescentes accesibles a este agente; K es la constante de Stern-Volmer y Q es la concentración de KI.

RESULTADOS

La infectividad del rotavirus RRV es dependiente de la concentración de calcio. Para estudiar el efecto del calcio sobre la infectividad de los rotavirus, se utilizó el rotavirus RRV que es una cepa aislada del mono Rhesus, la cual ha sido ampliamente caracterizada bioquímica y molecularmente [Estes, 1996 #764]. El virus RRV se preincubó con diferentes concentraciones de CaCl_2 , partiendo de 1.8 mM que es la concentración a la que normalmente se encuentra este ion en el medio de cultivo y se utilizó para infectar una monocapa de células MA104. Se encontró que la infectividad viral se incrementó a medida que se aumentó la concentración de calcio. Este incremento llegó a ser de alrededor de 4 veces sobre el control (considerado como la infectividad del virus en 1.8 mM CaCl_2), cuando se utilizó 10 mM CaCl_2 (Figura 1). No fue posible utilizar concentraciones más altas de calcio ya que resultaron ser tóxicas para las células. En base a esta observación, los siguientes experimentos se realizaron en presencia de 10 mM CaCl_2 , utilizando 2 mM de CaCl_2 como la concentración control.

Influencia de otros iones divalentes sobre la infectividad viral. Para estudiar si el efecto del calcio sobre la infectividad viral era debido a un efecto específico de este ion, o bien se debía a un efecto de carga, se realizaron infecciones con el rotavirus RRV en presencia de distintos iones divalentes (Ca^{+2} , Ba^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Sr^{+2} y Zn^{+2}) a una concentración de 10mM (Tabla 1). Se encontró que el estroncio fue el único otro ion divalente capaz de causar un efecto similar al del ion calcio. El manganeso y el zinc, a la concentración utilizada, resultaron tóxicos para las células, por lo que no fue posible determinar su efecto sobre la infectividad viral. El hecho de que sólo el estroncio fuese capaz de mimetizar el efecto del calcio no resultó inesperado ya que estos dos iones poseen un radio iónico muy semejante, por lo que se ha observado que comparten

funciones estructurales similares en algunas proteínas (10, 15). Por otro lado, el hecho de que otros iones divalentes tales como el magnesio y el bario no hayan tenido efecto sobre la infectividad viral, sugiere que el efecto del calcio (y del estroncio) no es un efecto simplemente de carga, sino es un efecto específico.

El efecto del calcio es sobre la partícula viral. Para estudiar el nivel al cual el ion calcio ejerce su efecto, se realizaron varios ensayos; en primer lugar, la monocapa de células se preincubó con medio de cultivo suplementado con 10 mM de calcio, posteriormente se retiró este medio, se infectaron las células con el virus RRV, se dejó proseguir la infección y se determinó el título viral, comparándolo con una infección en la que las células fueron preincubadas con medio conteniendo 2mM de calcio, como control. Se encontró que la preincubación de las células con 10 mM de calcio no ocasionó un incremento de la infectividad de rotavirus (datos no mostrados), resultado que sugiere que el efecto del calcio, es principalmente sobre la partícula viral y no sobre las células.

Se sabe que a 4°C los rotavirus se unen a la célula, pero no son capaces de ingresar al citoplasma celular; para que esto ocurra se requiere que las células se encuentren a 37°C. Esta observación permite separar experimentalmente los eventos de unión y penetración del virus a su célula huésped. Para determinar que etapa durante las primeras interacciones del virus con la célula se favorece por el incremento de calcio en el medio, se realizó el siguiente experimento; el virus se adsorbió a las células en presencia de 2 mM ó de 10 mM calcio durante 30 minutos a 4°C, y posteriormente se cambió el medio a 10 mM ó a 2 mM calcio, respectivamente, y la temperatura se incrementó a 37°C para permitir la entrada del virus. Se encontró un incremento de la infectividad solamente en la condiciones en las que los virus se unieron inicialmente a la célula en presencia de 10 mM calcio a 4°C (Figura 2). Cuando los virus se adsorbieron a la célula en presencia de 2mM calcio y posteriormente se aumentó la concentración a 10 mM calcio no se observó ningún incremento de la infectividad viral. Estos resultados

sugieren que el calcio podría tener un papel importante durante la unión del virus a su célula huésped.

Para confirmar si efectivamente el calcio favorece la unión del virus a la célula, se realizó un ensayo de unión, en el que virus purificado se incubó con las células en presencia de 2 ó 10 mM de calcio, durante 1 hora a 4°C, y posteriormente, después de lavar el virus excedente, se agregó MEM a las células. Las partículas virales que se unieron específicamente a las células se cuantificaron mediante un ensayo de ELISA. En la figura 3A se muestran los resultados de este ensayo, en los que se puede observar que la unión del virus en las dos condiciones de calcio que se probaron es muy similar, esto es, no se observó una diferencia significativa en la cantidad de virus unido a las células en 2 mM o en 10 mM calcio. Sin embargo, cuando se cuantificó la infectividad del virus unido a la célula en 2 mM o en 10 mM calcio, se repitió la observación de que los virus en presencia de 10 mM calcio incrementan su infectividad con respecto a los controles en 2 mM calcio (Figura 3B).

Estos datos, en conjunto, indican que la presencia de 10 mM de calcio en el medio extracelular no aumenta el número de partículas virales que se unen a la superficie de la célula en relación a calcio 2 mM. Sin embargo, también muestran que un porcentaje mayor de partículas unidas en 10 mM calcio es capaz de infectar la célula, en comparación a aquellas unidas en calcio 2 mM. Estas observaciones sugieren que la adsorción del virus en 10 mM calcio favorece la unión específica al receptor o receptores presentes en la membrana celular, lo que resulta en un incremento en el número de partículas capaces de penetrar e infectar productivamente a la célula.

Efecto del calcio sobre la infectividad de RRV, en células tratadas con neuraminidasa. La unión a la célula huésped de muchos de los rotavirus aislados de especies animales es dependiente de la presencia de ácidos siálicos (AS) en la superficie celular. Así, el tratamiento de las células con enzimas que remueven los AS

(neuraminidasas) reduce marcadamente la unión de las partículas virales a la célula, con la consecuente reducción de la infectividad del virus. De acuerdo a esto, se ha sugerido que el receptor para los rotavirus de origen animal es un compuesto que contiene AS (14). A diferencia de los rotavirus de origen animal, los rotavirus aislados de humanos se unen a las células permisivas a través de un receptor que no contiene AS (ya que es resistente al tratamiento con neuraminidasa) y del cual no hay ninguna información.

El rotavirus de simio RRV requiere de la presencia de AS sobre la superficie de la célula para unirse e infectarla (23), y en consecuencia, el tratamiento de las células con neuraminidasa abate la infección de este virus. Para estudiar si el aumento de calcio en el medio modifica las interacciones iniciales del virus RRV con la superficie de la célula, se realizaron ensayos de infectividad en presencia de 2 mM o de 10 mM de CaCl_2 , sobre células MA104 que habían sido previamente tratadas con concentraciones crecientes de neuraminidasa. En este experimento se incluyó la cepa de rotavirus nar3, que es una mutante aislada a partir del rotavirus de simio RRV que ya no depende de la presencia de AS sobre la superficie de la células para infectarlas. La figura 4 muestra los resultados de este ensayo; cuando se midió la infectividad del virus RRV en 2 mM de calcio, se observó la dependencia de este virus por el AS ya que su infectividad disminuyó hasta en un 75% cuando las células se trataron con 20 mU/ml de neuraminidasa, como ya había sido reportado (23). Sin embargo, cuando este ensayo se realizó en presencia de 10 mM de calcio, se encontró una menor dependencia del rotavirus RRV por el AS, ya que a la misma concentración de neuraminidasa (20 mU/ml) la infectividad de RRV sólo se redujo un 15%. La infectividad del virus mutante nar3, que se incluyó como control en este experimento, permaneció constante en ambas concentraciones de calcio. Estos resultados sugieren que el calcio facilita una interacción del virus con la superficie de la célula que es independiente de la presencia de AS, posiblemente a través de inducir un cambio conformacional en la partícula viral.

Efecto del calcio sobre la infectividad de distintas cepas de rotavirus. Para estudiar que tan general es el efecto del calcio sobre la infectividad de distintos aislados del virus, se realizaron ensayos de infectividad con cepas de rotavirus aisladas de diferentes especies animales, en presencia de 2 mM o de 10 mM de calcio. Se observó que todas las cepas estudiadas incrementaron su infectividad en presencia de 10 mM de calcio, independientemente de su origen (Tabla 2), aunque la magnitud del incremento en la infectividad fue variable; observándose incrementos entre 2 veces (NCDV) y 50 veces (DS-1); estos resultados sugieren que el aumento de la concentración de calcio en el medio durante las primeras interacciones del virus con la célula, tiene un efecto generalizado sobre la infectividad de los rotavirus. Este no fue el caso para virus pertenecientes a otras familias tales como poliovirus y reovirus, cuya infectividad no se vio alterada en las diferentes concentraciones de calcio probadas (Tabla 2).

Fluorescencia intrínseca de las partículas de rotavirus. La espectroscopia de fluorescencia es una técnica utilizada para evaluar cambios en la estructura terciaria o secundaria de las proteínas, basada en la fluorescencia intrínseca de los residuos aromáticos presentes en las proteínas. Como un método para determinar si el calcio es capaz de inducir cambios conformacionales en la partícula viral, se hicieron mediciones de la fluorescencia intrínseca de los triptofanos accesibles en las partículas virales completas (TLPs) y de las partículas carentes de las proteínas de la capa externa VP4 y VP7 (DLPs) en presencia de 2 mM o de 10 mM CaCl_2 . Se observó que al aumentar la concentración de calcio en el medio a 10 mM se produjo un cambio en el espectro de emisión de las TLPs. Este no fue el caso para el espectro de emisión de las DLPs, cuya intensidad de fluorescencia permaneció constante en ambas concentraciones de calcio (Figura 5). Como controles de este ensayo se midieron los espectros de emisión de una solución de triptofanos en 2 mM y en 10 mM CaCl_2 , en los que no se observó un cambio en la intensidad de la fluorescencia debida al aumento de calcio en el medio. También se

realizó el espectro de emisión de las TLPs en presencia de 10 mM $MgCl_2$ y no se encontró cambio en la intensidad de fluorescencia debida al aumento de la concentración de este ion divalente (datos no mostrados). Estos resultados, en conjunto, indican que el calcio ocasiona un cambio conformacional en la partícula viral completa, y más específicamente sobre la conformación de la proteínas virales de la capa externa.

Para confirmar esta observación se realizaron estudios de apagamiento de la fluorescencia de las TLPs de rotavirus con ioduro de potasio (KI). Este tipo de ensayo permite la cuantificación de los residuos de triptofanos expuestos en la superficie de una proteína o en este caso en la partícula viral. Se cuantificó el porcentaje de triptofanos expuestos en las TLPs de los virus RRV y nar3, en presencia de 2 mM y de 10 mM de calcio. La tabla 3 muestra el resultado de estas determinaciones en las que se encontró que el porcentaje de triptofanos expuestos en los dos virus analizados aumentó cuando las TLPs se encontraban en 10 mM de calcio con respecto a la condición en 2 mM de calcio.

Estos resultados sugieren que el incremento en la concentración afecta la conformación del virus, lo que resulta en una mayor exposición de residuos de triptofano en la partícula viral. Posiblemente estos cambios en la conformación del virus sean los responsables de permitir una interacción virus-célula más eficiente, con el consecuente un incremento en la infectividad viral.

DISCUSION

Las infecciones virales están generalmente limitadas a especies, tejidos y tipos celulares específicos. Este tropismo se debe a factores del huésped que permiten la replicación viral. Dentro de estos factores, uno de los más importantes son los receptores, ya que la infección se inicia a través de la interacción del virus con moléculas específicas en la superficie de la célula blanco. Además de servir como punto inicial de unión, los receptores juegan un papel importante en otros eventos tempranos de la infección, tales como la penetración y el desnudamiento de las partículas virales. Por lo tanto, su caracterización, así como la de los componentes del virus involucrados en las interacciones con el receptor, y los factores que influyen en estas interacciones, son relevantes para entender los mecanismos moleculares de la patogénesis viral. Este conocimiento, a su vez, debe contribuir para el diseño racional de medidas para el control de la infección.

Para que un virus infecte a una célula, se requiere un conjunto de eventos secuenciales durante los cuales las partículas virales sufren cambios conformacionales, como consecuencia de la(s) interacción(es) de las proteínas virales con moléculas presentes en la superficie celular; estos cambios pueden ser influenciados por la presencia de ciertos iones. Existen varios estudios en los que se ha encontrado que el calcio juega un papel importante en las interacciones iniciales de algunos virus con su célula huésped (2, 26). Por ejemplo, se ha observado que este catión participa en la estabilidad de poliomavirus (32), rinovirus (34), SV40 (30), nodavirus (31), y algunos virus de plantas, aunque hasta el momento no se ha identificado una secuencia consenso de unión a calcio que esté presente en las proteínas de estos virus. La unión de algunos virus a su receptor puede también depender de la presencia de calcio, por ejemplo, para el virus de coksackie (26), el virus de la hepatitis A (2), el virus de la fiebre aftosa (26), y algunos rinovirus

(34). En el caso del virus de la inmunodeficiencia adquirida, VIH, se ha observado que el calcio es necesario durante el proceso de fusión del virus a la membrana celular (9, 11), y más recientemente se reportó que la infectividad de los parvovirus es dependiente de la concentración de este ion (29). Como se ha mencionado previamente, varias etapas del ciclo replicativo de los rotavirus también dependen de las concentraciones de calcio en los distintos compartimentos celulares.

En este trabajo se exploró el efecto del calcio sobre la infectividad de los rotavirus, se encontró que la infectividad de éstos es dependiente de la concentración de calcio presente en las etapas iniciales de la infección. A la concentración máxima que fue posible realizar los ensayos sin comprometer la viabilidad celular (10mM), se encontraron incrementos de la infectividad que variaron entre 2 y 50 veces sobre la infectividad basal en 2 mM, dependiendo de la cepa de rotavirus que se ensayó. En particular, es de llamar la atención que de las cepas de rotavirus aisladas de humano, DS-1 y ST3, aumentaron su infectividad en alrededor de 57 y 41 veces, respectivamente (Tabla 3). Este efecto resultó ser específico para los rotavirus ya que la infectividad de otros virus, como poliovirus y reovirus, no se modificó. También se encontró que este efecto es específico del calcio y no de otros iones divalentes (con excepción del estroncio), lo que permite concluir que el efecto observado no es simplemente debido a las cargas positivas del ion divalente.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el efecto del calcio es primordialmente sobre las interacciones tempranas del rotavirus con la célula huésped. Al analizar el nivel en el que el calcio pudiese estar participando, se encontró que si bien la unión de los virus en las dos condiciones de calcio (2mM y 10 mM) es muy similar, aquellos virus que se unen en calcio alto son más eficientes para los siguientes pasos de la infección. Es un fenómeno bien caracterizado que del total de partículas virales producidas como resultado de una infección, existe una proporción de partículas virales

que no son infecciosas, denominadas partículas físicas. En los rotavirus la relación entre las partículas infecciosas (PI) y las físicas (PF) es variable y depende del origen de la cepa; por ejemplo, se ha determinado que en el caso del virus de simio RRV, la relación PI/PF es de 1/100, mientras que en el caso de los rotavirus de origen humano, por ejemplo para la cepa Wa, esta relación es 1/30,000 (24). Las observaciones realizadas en este trabajo sugieren que el incremento de calcio ocasiona un cambio en la relación PI/PF, de modo que a pesar de que se unen a la célula la misma cantidad de partículas en las dos condiciones de calcio ensayadas, el número de partículas que ingresan a la célula, y se replican productivamente, aumenta notablemente en presencia de 10 mM de calcio. La observación mencionada anteriormente de que la infectividad de los rotavirus de humano DS-1 y ST3 aumentan del orden de 50 veces, sugiere que la relación PI/PF en condiciones de alto calcio será del orden de 1/600, muy cerca de los valores obtenidos para cepas de virus animales. De qué depende la relación PI/PF no es claro, sin embargo, esta es posiblemente una de las razones por las cuales los virus de origen humano han resultado difíciles de propagar en cultivos celulares.

Dado que en este trabajo se observó que concentraciones elevadas de calcio producen un incremento significativo en la infectividad de las cepas de rotavirus aisladas de humano, este hallazgo ofrece la oportunidad de realizar estudios que no habían sido factibles anteriormente. Por ejemplo, recientemente ha habido un gran avance en el conocimiento de los receptores celulares, y de las proteínas virales involucradas en las primeras interacciones virus-célula huésped, utilizando como modelo al rotavirus de simio RRV (16, 17). Sin embargo, es muy poco lo que se ha logrado avanzar en este tema con los rotavirus de humano. La posibilidad de crecer rotavirus de humano con eficiencias similares a los aislados de animales permitirá mejorar rápidamente nuestro conocimiento sobre ellos, lo que debiera contribuir a desarrollar medidas racionales de control contra las gastroenteritis infantiles causadas por estos rotavirus.

CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que el aumento de calcio en el medio, durante las etapas iniciales de la infección, causa un incremento en la infectividad de los rotavirus. Este incremento es posiblemente consecuencia de cambios conformacionales en la partícula inducidos por el calcio, los cuales permiten una interacción mas eficiente del virus con la superficie de la célula. Este efecto del calcio es general para todas las cepas de rotavirus que se ensayaron, independientemente del huésped del que fueron aisladas. Esta observación es especialmente relevante en el caso de los rotavirus aislados de humanos, ya que estas cepas son difíciles de propagar en cultivos celulares, lo que ha retrasado su caracterización inmunológica y molecular.

REFERENCIAS

1. **Arias, C. F., M. Lizano, and L. S.** 1987. Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J. Gen. Virol.* **68**:633-642.
2. **Bishop, N. E., and A. D.A.** 1997. Early interaction of hepatitis A with cultured cells: viral elution and the effect of pH and calcium ions. *Arch. Virol.* **142**:2161-2178.
3. **Bishop, R., G. Davidson, I. Homes, and B. Ruck** 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis *Lancet*:1281-1283.
4. **Both, G. W., J. S. Matick, and A. R. Bellamy** 1983. Serotype-specific glycoprotein of simian 11 rotavirus: coding assignment and gene sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**:3091-3095.
5. **Bresse, J. S., R. I. Glass, B. Ivanoff, and J. R. Gentsch** 1999. Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries *Vaccine.* **17**:2207-2222.
6. **Cohen, J., J. Laporte, A. Charpillienne, and R. Scherer** 1979. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* **60**:177-182.
7. **Cook, S. M., R. I. Glass, C. W. Le Baron, and M.-S. Ho** 1990. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ.* **68**:171-177.
8. **Coulson, B. S., S. L. Londrigan, and D. J. Lee** 1997. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:5389-94.
9. **Doranz, B. J., S. S. Baik, and R. W. Doms** 1999. Use of gp120 binding assay to dissect the requirements and kinetics of human immunodeficiency virus fusion events. *J. of Virol.* **73**:10346-10358.
10. **Drake, S. K., K. L. Lee, and J. J. Falke** 1996. Tuning the equilibrium ion affinity and selectivity of the EF-hand calcium binding motif: substitutions at the gateway position *Biochem.* **35**:6697-6705.
11. **Ebenbichler, C. F., H. Stoiber, R. Schneider, J. R. Patsch, and M. P. Dierich** 1996. The human immunodeficiency virus type 1 transmembrane gp41 protein is a calcium-binding protein and interacts with the putative second-receptor molecules in a calcium-dependent manner *J. of Virol.* **70**:1723-1728.
12. **Estes, M. K.** 1996. Rotaviruses and their replication, p. 1625-1655. *In* B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (eds), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York.
13. **Estes, M. K., and J. Cohen** 1989. Rotavirus gene structure and function *Microbiol Rev.* **53**:410-49.
14. **Fukudome, K., O. Yoshie, and T. Konno** 1989. Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption *Virology.* **172**:196-205.
15. **Gu, C., and D. M. F. Cooper** 2000. Ca^{2+} , Sr^{2+} , and Ba^{2+} identify distinct regulatory sites on adenylyl cyclase (AC) types Vi and VIII and consolidate the apposition of capacitative cation entry channels and Ca^{+2} -sensitive ACs. *J. Biol. Chem.* **275**:6980-6986.
16. **Guerrero, C. A., E. Mendez, S. Zarate, P. Isa, S. Lopez, and C. F. Arias** 2000b. Integrin mediates rotavirus cell entry *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:14644-14649.

17. **Guerrero, C. A., S. Zarate, G. Corkidi, S. Lopez, and C. F. Arias** 2000a. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells *J. of Virol.* **74**:9362-9371.
18. **Guo, C., O. Nakagomi, M. Mochizuki, H. Ishida, M. Kiso, Y. Ohta, T. Suzuki, D. Miyamoto, K. I. Jwa Hidari, and Y. Suzuki** 1999. Ganglioside GM1a on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. *J. Biochem. (Tokyo).* **126**:683-688.
19. **Kapikian, A. Z., and R. M. Chanock** 1996. Rotaviruses, p. 1657-1708. *In* B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (eds), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York.
20. **Lakowicz, J. R.** 1986. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Ed. ed. Plenum Press, New York, USA.
21. **Lehrer, S. S.** 1971. Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochemistry.* **10**:3254-3263.
22. **Londrigan, S. S., M. J. Hewish, M. J. Thomson, G. M. Sander, H. Mustafa, and B. S. Coulson** 2000. Growth of rotaviruses in continuous human and monkey cell lines that vary in their expression of integrins. *J. Gen. Virol.* **81**:2203 - 2213.
23. **Méndez, E., C. F. Arias, and S. López** 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* **67**:5253-5259.
24. **Mendez, E., S. Lopez, M. A. Cuadras, P. Romero, and C. F. Arias** 1999. Entry of rotaviruses is a multistep process *Virology.* **263**:450-459.
25. **Rolsma, M. D., T. B. Kuhlenschmidt, H. B. Gelberg, and M. S. Kuhlenschmidt** 1998. Structure and function of a ganglioside receptor for porcine rotavirus *J Virol.* **72**:9079-91.
26. **Ruiz, M. C., J. Cohen, and F. Michelangeli** 2000. Role of Ca⁺² in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infectious *Cell Calcium*:137-149.
27. **Santi, C. M., T. Santos, A. Hernandez-Cruz, and A. Darszon** 1998. Properties of a novel pH-dependent Ca²⁺ permeation pathway present in male germ cells with possible roles in spermatogenesis and mature sperm function. *J.Gen.Physiol.* **112**:33-53.
28. **Sharabari, M. S., and P. W. Lee** 1987. Bovine rotavirus maturation is a calcium dependent process *Virology.* **158**:103-111.
29. **Simpson, A., V. Chandrasekar, B. Hebert, G. M. Sullivan, M. G. Rossmann, and C. R. Parrish** 2000. Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsids canine and feline parvoviruses *J. Mol. Biol.* **300**:597-610.
30. **Sthele, T., S. J. Gamblin, Y. Yan, and S. C. Harrison** 1996. The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution *Structure.* **4**:165-182.
31. **Wery, J. P., V. S. Reddy, M. V. Hosur, and J. E. Johnson** 1994. The refined three-dimensional structure of an insect virus at 2.8Å resolution *J. Mol. Biol.* **235**:565-586.
32. **Yang, Y.-W., and C.-C. Teng** 1998. Circular dichroism and fluorescence studies of polyomavirus major capsid protein VP1 *J. of Prot. Chem.* **17**:61-71.
33. **Zarate, S., R. Espinosa, P. Romero, E. Mendez, C. F. Arias, and S. Lopez** 2000a. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J. Virol.* **74**:593-599.
34. **Zhao, R., A. T. Hadfield, M. J. Kremer, and M. G. Rossmann** 1997. Cations in human rhinoviruses *Virology.* **227**:13-23.

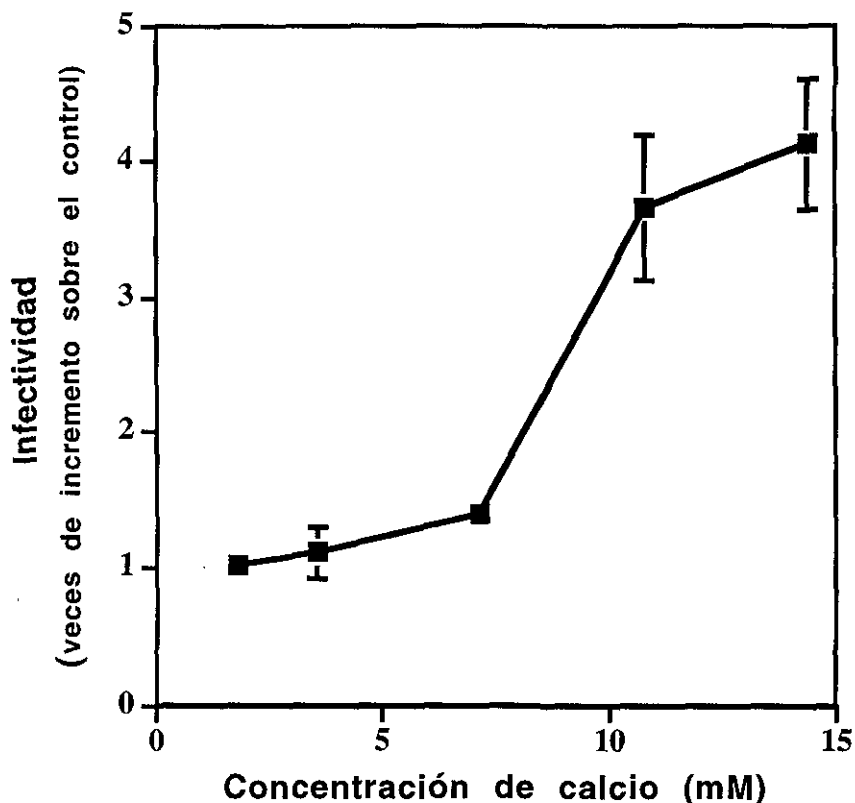


Figura 1. Efecto de la concentración de calcio sobre la infectividad del rotavirus RRV. Monocapas de células MA104 se infectaron por 1 hora a 37°C con rotavirus RRV en presencia de las concentraciones indicadas de calcio. El virus excedente se retiró, se añadió MEM sin suero con 1.8 mM de CaCl₂ y la infección se dejó proseguir por 14 h a 37°C; tiempo al que las células se fijaron y se inmunotifieron como está descrito en Material y Métodos. La infectividad viral se expresa como el número de veces de incremento de la infectividad del virus en las diferentes concentraciones de calcio sobre la infectividad del virus en MEM con 1.8 mM de CaCl₂. Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes, con su respectiva desviación estándar (DS).

TABLA 1. Efecto de distintos iones divalentes sobre la infectividad del rotavirus RRV.

Ion divalente	Infectividad viral
	(incremento sobre el control) ^{a)}
BaCl ₂	0.95 ± 0.04
CaCl ₂	5.65 ± 0.21
SrCl ₂	3.70 ± 0.56
MgCl ₂	0.85 ± 0.07

^{a)} La infectividad se expresa como veces de incremento de la infectividad viral en 10 mM de cada ión divalente, sobre la infectividad viral en 2mM CaCl₂, y representa el promedio de tres experimentos independientes con su DS.

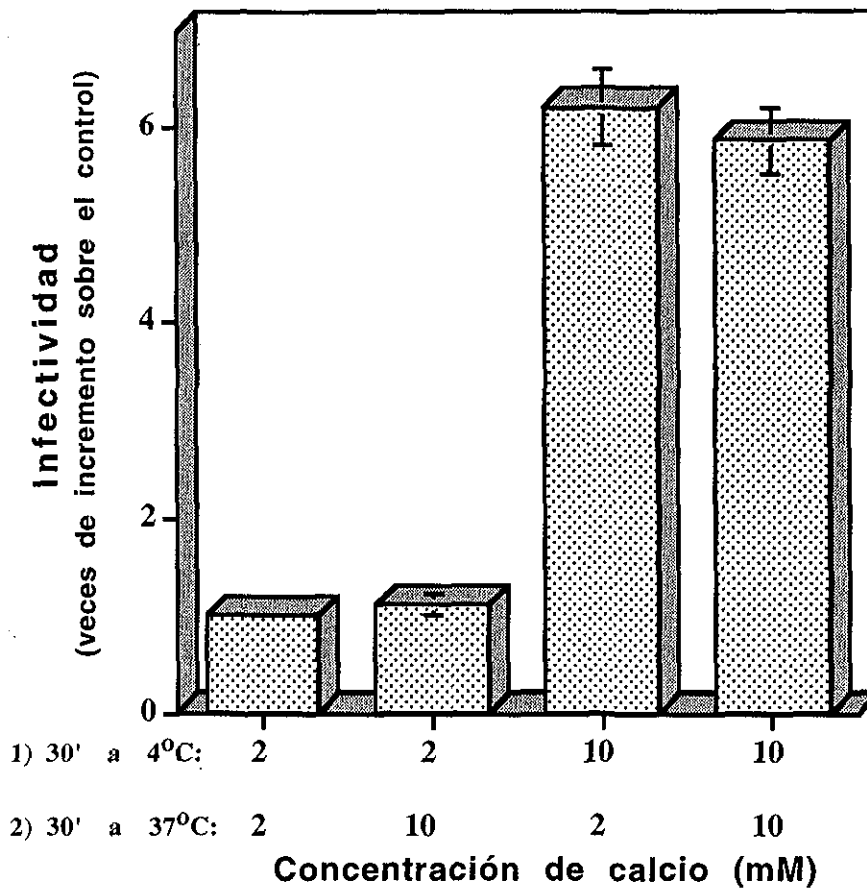


Figura 2. Efecto del calcio sobre las primeras interacciones del rotavirus RRV con su célula huésped. El virus RRV en presencia de 2 mM ó de 10 mM CaCl_2 , se adsorbió durante 30 min a 4°C sobre monocapas de células MA104, se retiró el exceso de virus y se añadió medio a 37°C conteniendo 2mM ó 10 mM CaCl_2 durante 30 min. Posteriormente se retiró este medio y la infección se dejó proseguir por 14 h a 37°C en MEM sin suero. Las células se procesaron como se indica en la figura 1. Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes con su DS.

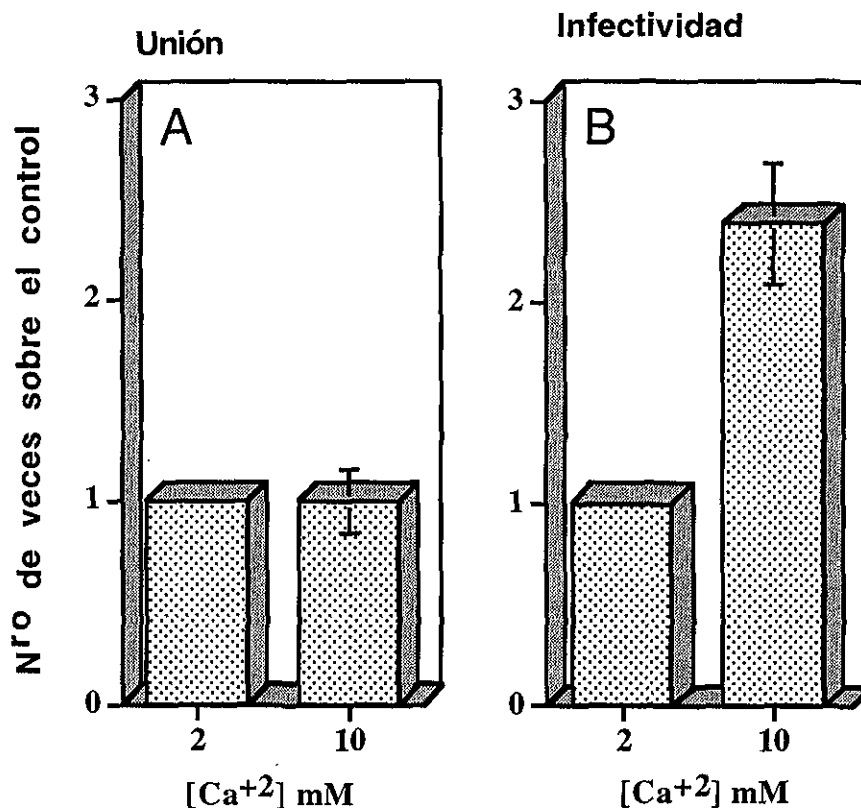


Figura 3. Efecto de la concentración de calcio sobre la unión y la infectividad del rotavirus RRV. Monocapas de células MA104 se incubaron durante 1 hora a 4°C con 500 ng de virus purificado en MEM con 2 mM ó 10 mM de CaCl₂. Se lavó el exceso de virus y se lisaron las células. A) En el lisado viral se cuantificó el virus unido mediante ELISA. La unión del virus a la célula se expresa como valor relativo al valor de DO₄₀₅ que se obtuvo en el ensayo de unión del virus en 2mM CaCl₂. B) Monocapas de células MA104 se infectaron con una alícuota del lisado viral en MEM con 2 mM ó 10 mM de CaCl₂; después de 1 h de adsorción a 4°C, se retiró el virus excedente y la infección se continuó por 14 h a 37°C en MEM sin suero. Las células se fijaron y se inmunotifieron como está descrito en Material y Métodos. La infectividad viral se expresa como el número de veces de incremento de la infectividad del virus en 10 mM CaCl₂ sobre la infectividad del virus en 2 mM de CaCl₂. Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos realizados en forma independiente, con su respectiva DS.

TABLA 2. Efecto del calcio sobre la infectividad de distintas cepas de rotavirus

Virus	Especie de origen	Infectividad en 10 mM CaCl ₂ *
DS-1 ^a	humano	57 ± 19
69M ^b	humano	3.4 ± 0.3
Wa ^c	humano	7.4 ± 0.3
ST3 ^d	humano	41.3 ± 16
B223 ^a	bovino	4.8 ± 0.1
NCDV ^d	bovino	1.9 ± 0.6
RF ^e	bovino	4.5 ± 0.4
UK ^d	bovino	7 ± 0.2
MDR-13 ^f	porcino	19 ± 0.1
YM ^g	porcino	4.3 ± 0.5
H2 ^d	equino	4 ± 1.7
L338 ^d	equino	3 ± 1
SA11 4S ^h	simio	2.5 ± 0.2
RRV ^c	simio	5.7 ± 0.2
Nar3 ^g	simio	10.4 ± 1.1
TY-1 ^a	pavo	19 ± 5
CH-2 ^a	pollo	11 ± 0.2
poliovirus ⁱ	humano	1 ± 0.17
reovirus ^j	humano	1.1 ± 0.15

^a Y. Hoshino. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; ^b G.N. Woode. College of Veterinary Medicine. Texas A&M University. USA; ^c H.B. Greenberg. Stanford University, Palo Alto, CA, USA; ^d D.R. Snodgrass. Moreland Research Institute, Edinburgh, U. K.; ^e J. Cohen. Institut National de la Recherche Agronomique, Cedex, France; ^f I.H. Holmes. University of Melbourne, Victoria, Australia; ^g Este laboratorio, IBT-UNAM. Mex; ^h M.K. Estes. Baylor College of Medicine, Houston, Texas. USA. ⁱ R..M. del Angel, CINVESTAV-IPN, Mex. ^j C. Ramos, CISEI, Instituto Nacional de Salud Pública, Mex.

*Los datos se expresan como veces de incremento sobre la infectividad de la misma cepa en 2mM CaCl₂.

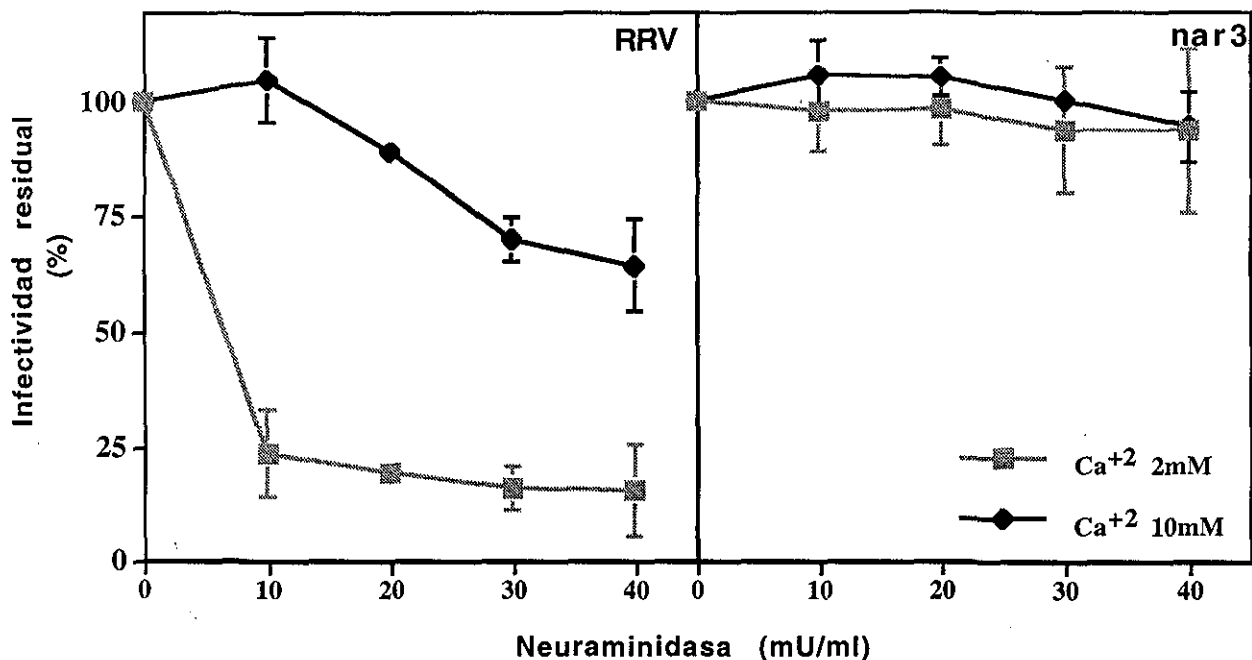


Figura 4.- Efecto del calcio sobre la infectividad de rotavirus en células tratadas con neuraminidasa. Monocapas confluentes de células MA104 se trataron con diferentes concentraciones de neuraminidasa (según se indica en la figura) por 1 hora a 37°C. Las células así tratadas se infectaron con los rotavirus RRV y nar3 en presencia de 2 mM ó 10 mM CaCl₂ y el ensayo de infectividad se llevo a cabo como está descrito en Material y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de la infectividad en cada condición con respecto a la infectividad del virus en células no tratadas con neuraminidasa. Los datos mostrados representan el promedio de 3 experimentos independientes con su respectiva DS.

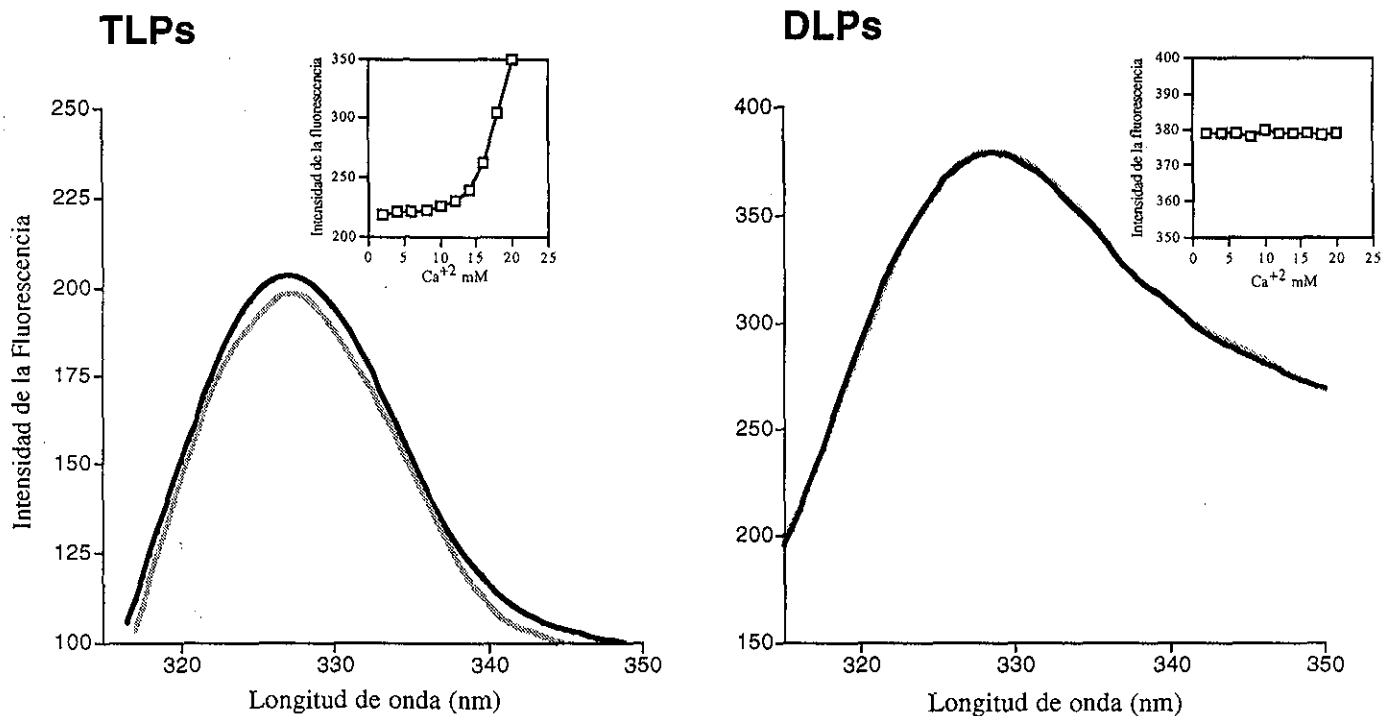


Figura 5.- Espectros de emisión de las partículas de rotavirus RRV. El espectro de emisión de las partículas virales completas (TLP)s y de aquellas sin la capa externa de proteínas (DLPs) se midió como se describe en Material y Métodos. (—) Espectro de emisión en 2 mM calcio, (—) Espectro de emisión en 10 mM calcio. Las gráficas insertadas muestran el cambio en la intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de calcio. Las intensidades de fluorescencia que se muestran son el promedio de 3 mediciones. Las repeticiones de los espectros de emisión mostraron siempre el mismo patrón de cambio.

TABLA 3. Porcentaje de triptofanos expuestos en la partícula viral

Virus	2 mM CaCl₂	10 mM CaCl₂
RRV	35.5% ± 2.18	45.77% ± 4.21
Nar	22.43% ± 0.96	39.88% ± 2.31

* Los valores representan el porcentaje de triptofanos expuestos en las partículas virales en las condiciones de calcio indicadas y son el promedio de 3 experimentos independientes con su DS.