



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“EFECTO DEL pH SOBRE LA ENTRADA DE
ASTROVIRUSHUMANO SEROTIPO 8
A SU CÉLULA HUÉSPED”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

CLAUDIA MUÑOZ YÁÑEZ

DIRECTOR DE TESIS DR. ERNESTO MÉNDEZ SALINAS

CUERNAVACA, MOR.

DICIEMBRE DE 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Susana López y el Dr. Carlos Arias por haberme permitido trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Luis Padilla y al Dr. Baltazar Becerril por sus valiosas aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros en el laboratorio, Martha, Pedrito, Hilda, Michelle, Daniela, Margarito, Tomás, Vicky, Pavel, Liliana, Camilo, Rafa y Miguel, por hacer mi estancia tan agradable.

A mis amigas Rocío, Gaby, Rosa y Magaly por brindarme su amistad. Rosa gracias por tus ricos postres. Rocío muchas gracias por tus consejos y apoyo desde el principio. Gaby gracias por compartir tu mesa y todos tus reactivos y sobretodo tus amenas pláticas.

A Ernesto gracias por todo lo que me enseñaste con tanta paciencia.

A mi familia por apoyarme desde el principio y en cada separación aun cuando no estaban de acuerdo, no lo hubiera logrado sin su ayuda.

ÍNDICE

Resumen.....	2
I. Introducción.....	
Generalidades de Astrovirus.....	
Importancia de Astrovirus.....	3
Características Físicas.....	4
Composición Genética.....	5
Procesamiento Proteolítico.....	9
Entrada de virus a la célula.....	13
II. Justificación.....	20
III. Objetivos.....	21
IV. Materiales y Métodos.....	
Células.....	22
Virus.....	22
Tiempo de pegado.....	22
Efecto de agentes que afectan endocitosis sobre la infectividad de astrovirus....	23
Determinación por ELISA de cambios promovidos por pH en Yuc8.....	24
Efecto del pH ácido en la entrada de Yuc8.....	24
V. Resultados y Discusión.....	
Velocidad de pegado de Yuc8.....	26
Efecto de diferentes drogas sobre la infección de Yuc8.....	28
Participación de catepsinas durante la entrada.....	31
Cambios en la reactividad con anticuerpos por pH ácido.....	33
Efecto del pH ácido sobre el virus.....	35
Efecto del pH ácido después del proceso de adsorción del virus.....	37
Efecto de un inhibidor del proteasoma en el proceso de entrada.....	40
VI. Conclusiones.....	43
VII. Bibliografía.....	44

RESUMEN

Experimentos realizados previamente, en el laboratorio, sugieren que la endocitosis mediada por clatrina es la vía de entrada de Yuc8 a células Caco-2. Se ha visto que los virus que entran por esta ruta pasan a través de vesículas endocíticas que se acidifican, madurando posteriormente a lisosomas. Este ambiente ácido promueve cambios estructurales en los virus, que les permiten penetrar al citosol para iniciar su replicación. En este trabajo se probaron drogas que inhiben la acidificación de endosomas (NH_4Cl y Bafilomicina-A1) así como un inhibidor del reclutamiento de clatrina (Clorpromacina). La Clorpromacina y la Bafilomicina-A1 bloquearon la infección, mientras que el NH_4Cl no afectó la infectividad de Yuc8, pero sí la de reovirus usado como control. Debido a estos resultados parcialmente contradictorios evaluamos el efecto del pH ácido, el cual puede actuar a dos niveles: activando enzimas endosomales o directamente sobre el virus, promoviendo cambios estructurales. Para evaluar la posible participación de proteasas endosomales se probaron inhibidores de catepsinas B y L, ninguno de los cuales bloqueó la entrada del virus. Por otro lado, para evaluar posibles cambios estructurales en el virus promovidos por el pH ácido, se hicieron experimentos tratando el virus con pH ácido antes o durante la infección, en presencia o ausencia de drogas. El tratamiento con pH ácido no permitió al virus evadir el efecto de la Bafilomicina-A1 pero sí el de la Clorpromacina de manera parcial. Además de las drogas, para evaluar posibles cambios estructurales promovidos por el pH ácido se midió, por ELISA, cambios de reactividad con diferentes anticuerpos cuando el virus está tratado a pH 7 ó 5. El pH ácido provocó un mejor reconocimiento, por un anticuerpo, del virus, sugiriendo que por sí mismo, el pH puede promover cambios estructurales en el virus. Con estos resultados se puede concluir que el pH ácido parece ser importante durante el proceso de entrada de Yuc8, sin embargo no parece ser el único factor involucrado.

Además del ambiente endosomal, algunos virus que entran por endocitosis dependiente de clatrina requieren que su receptor sea ubiquitinado para entrar en la célula. Debido a esto se probó MG132 (que disminuye la ubiquitina libre en el citosol) sobre la infectividad de Yuc8. El MG132 inhibe los eventos tempranos del virus sobre la célula. Lo anterior sugiere que la ubiquitina libre en el citosol posiblemente es necesaria durante la entrada de Yuc8 a células Caco-2.

ANTECEDENTES

GENERALIDADES DE ASTROVIRUS HUMANO

Importancia de Astrovirus

Los astrovirus humanos han sido identificados, como la segunda causa más importante de gastroenteritis en niños menores de 5 años, después de los rotavirus. Son responsables de alrededor de 2 al 3% de los casos de gastroenteritis viral infantil en países desarrollados, mientras que se han reportado incidencias de más de 26% en poblaciones aisladas de países en vías de desarrollo (11).

La infección por astrovirus en humanos (HAstV) provoca una diarrea que dura hasta 4 días; con vómito, fiebre, anorexia y dolor abdominal (23). Al parecer, la infección por astrovirus tiende a adquirirse durante una edad temprana, ya que el 70% de los niños en edad escolar son seropositivos, sin embargo, ya que también es frecuente en la edad senil, la inmunidad que se adquiere durante la infancia no parece proteger en la vejez (24).

La importancia de los astrovirus, como causantes de diarrea infantil se ha hecho patente a medida que se han desarrollado métodos de detección más sensibles (24). Actualmente, utilizando ensayos inmunoenzimáticos con anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes serotipos humanos(5), se ha encontrado que los astrovirus están asociados en promedio con el 8.6% de los casos de niños con diarrea (11).

Los astrovirus humanos son el prototipo de la familia *Astroviridae*, una familia de virus desnudos, de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva, cuyo genoma es infeccioso, es decir, puede iniciar una infección productiva cuando se introduce directamente a la célula huésped. La familia *Astroviridae* se divide en dos géneros, de acuerdo al Comité InteARNcional de Taxonomía de Virus: los Mamastrovirus, que infectan mamíferos, y los Avastrovirus, que infectan aves. En animales como cerdos, terneras, ovejas, venados, visones, ratones, patos, pavos y pollos, se han encontrado partículas virales de tamaño y morfología similar a los astrovirus observados en niños. Los Mamastrovirus además de causar gastroenteritis en humanos, provocan diarrea leve en ovejas y brotes diarreicos en visones. En el caso de las aves, los astrovirus son causantes de mortalidad en pavos, nefritis aguda en pollos y hepatitis mortal en patos (18, 30).

Se han identificado ocho serotipos de astrovirus humano basados en su reactividad con anticuerpos policlonales, mediante ensayos de inmunomicroscopía electrónica, inmunofluorescencia (IFA), neutralización, inmunoenzimáticos (ELISA) y análisis de secuencia o genotipificación. El serotipo 1 (HAstV-1) es el que se ha encontrado más frecuentemente en diversos estudios, mientras que el serotipo 8 (HAstV-8), se ha considerado como un serotipo raro ya que solo se ha reportado en algunas regiones de Reino Unido, Australia, Uganda, Gaza y México (26).

Características físicas

Por microscopía electrónica, las partículas de astrovirus muestran una cápside icosaédrica de aproximadamente 28 nm de diámetro con espículas emanando de la superficie lo cual puede dar un tamaño de hasta 41 nm. Las espículas dan al virus una

aparición en forma de estrella en su superficie, a lo que deben su nombre, aunque esta forma de estrella solo se puede percibir en el 10% de los virus en una preparación, y pueden inducirse por tratamiento alcalino (pH 10). Las partículas son inestables a un pH mayor a 10.5, mientras que permanecen estables a pH 3 y son resistentes a cloroformo, una variedad de detergentes (iónicos, no iónicos y zwitterionicos) y solventes lipídicos; mantienen su infectividad después de tratamientos térmicos de hasta 60°C por 5 minutos y parecen ser resistentes a bajas temperaturas de -70 a -85°C hasta por 10 años, pero no son estables a procesos repetidos de congelación y descongelación (23). En cuanto a su densidad, las partículas de astrovirus humanos forman bandas de entre 1.35 a 1.37 g/ml, en gradientes de CsCl, siendo la banda de mayor densidad aquella que contiene partículas con ARN, mientras que la banda de menor densidad está compuesta por partículas vacías.

Composición genética

El genoma de Astrovirus, con un tamaño aproximado de 6.8 Kb, contiene una cola de poli (A) de 31 nucleótidos en el extremo 3' y una región no traducida (RNT) de aproximadamente 80 nt en ambos extremos (35). El ARN genómico contiene tres marcos abiertos de lectura, denominados ORF1a, ORF1b y ORF2 (de acuerdo al inglés open reading frame), cada uno de los cuales codifica para una poliproteína. Mediante análisis de la secuencia de ORF1a y 1b se ha predicho la función de las proteínas para las que codifican y parecen corresponder a las proteínas no estructurales, es decir, aquellas que no están presentes en la partícula viral madura y que participan en la replicación del genoma viral (23). Después de la entrada del virus a la célula y la desencapsidación del genoma, las proteínas no estructurales (nsP1a y nsP1b) son las

primeras en ser traducidas directamente del ARN genómico. Las proteínas nspl1a y nspl1ab, una vez procesadas proteolíticamente, permiten la replicación de la cadena completa de ARN de polaridad negativa, la cual a su vez sirve de templado para la transcripción de dos moléculas de ARN de polaridad positiva pero de diferentes tamaños: el ARN genómico a partir del cual se sintetizan más proteínas no estructurales y que es usado para encapsidarse y, el ARN subgenómico que contiene el ORF2 y que servirá como templado para sintetizar la poliproteína precursora de la cápside (12) (Figura 1).

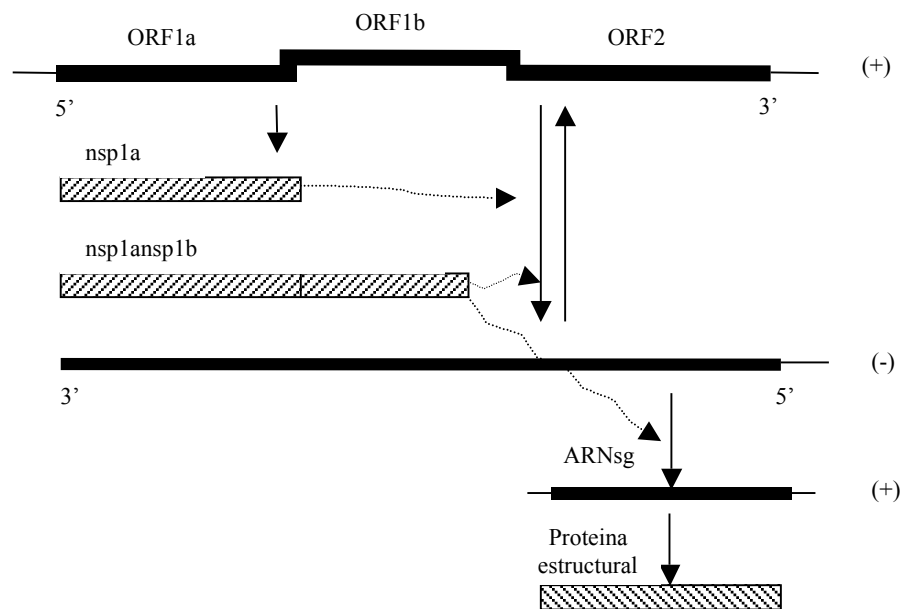


Figura 1. Replicación del genoma de astrovirus humano. Las proteínas no estructurales nspl1a y nspl1ab son traducidas directamente del ARN genómico de polaridad positiva; éstas a su vez intervienen en la replicación de este mismo ARN, para generar ARN de polaridad negativa, a partir del cual, a su vez, se transcribe el ARN genómico y el subgenómico, este último se traduce a la poliproteína estructural. Las líneas negras representan cadena de ARN, los rectángulos rayados indican proteínas virales.

Los ORF1a y 1b están en fases de lectura diferentes, y la traducción de ambos se lleva a cabo utilizando como templado el ARN genómico. Los dos productos primarios de este proceso son: nspl1a que deriva del ORF1a exclusivamente (13), y nspl1ab que contiene secuencias derivadas de ambos ORF's y que es traducido a través de un mecanismo de

cambio de fase promovido por señales localizadas al final del ORF1a en el ARN genómico (12).

ORF1a. Este ORF, que abarca desde el nucleótido 84 al nucleótido 2850, es traducido a un polipéptido de 922 aminoácidos (aproximadamente 130 kDa), nsp1a, el cual contiene un motivo de serin proteasa (aminoácidos 454-569). Se cree que el procesamiento proteolítico de las poliproteínas no estructurales a proteínas más pequeñas se lleva a cabo principalmente por la proteasa viral, codificada en el ORF1a, aunque al menos una proteasa celular también parece participar en este procesamiento (29). A pesar de tener un genoma mayor a los 6000 nt, no se han encontrado motivos de ARN helicasa en las proteínas de astrovirus como en todos los demás virus de ARN de polaridad positiva con genomas mayores a 6 Kb. Mediante análisis comparativo con secuencias de otros virus, se ha identificado una región de ORF1a que guarda similitud con secuencias que codifican para una proteína de unión a genoma VPg en *Caliciviridae*, *PicoARNviridae*, y *Potiviridae*, aunque no se ha demostrado experimentalmente (1). La proteína nsp1a contiene además una secuencia que codifica para una señal de localización nuclear (NLS) del aminoácido 666 al 682 aunque no se ha encontrado evidencia de que nsp1a sea direccionada al núcleo; entre los aminoácidos 139 y 372 se han predicho cuatro hélices transmembranales(6).

ORF1b. Éste se encuentra hacia la región 3' del ORF1a y se sobrepone con ORF1a por 70 nt. ORF1b (1, 542 nt) codifica para un producto de aproximadamente 513 aminoácidos (aa) (60 kDa) y contiene un motivo altamente conservado de ARN polimerasa dependiente de ARN. El producto de los ORF1a y ORF1b, nsP1ab, es

traducido por un cambio de fase ribosomal (5), usando una señal localizada dentro de los 70 nt en que se sobreponen estos ORFs, que incluye un heptámero con la secuencia A AAA AAC (común en todas las cepas de astrovirus humano secuenciadas) y una estructura de tallo-asa cercana al heptámero (12).

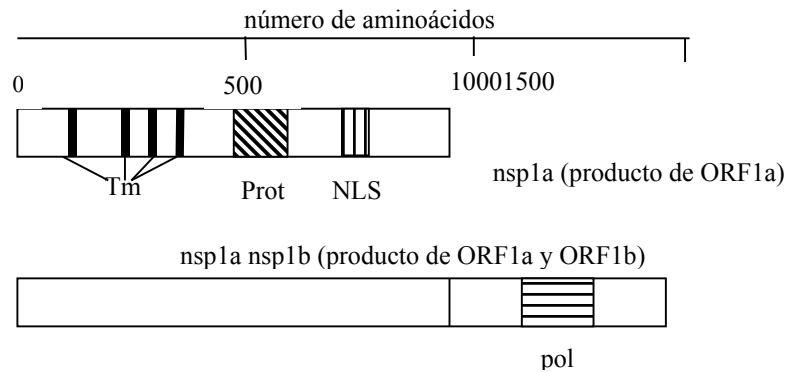


Figura 2. Proteínas no estructurales de HAstV. Los recuadros muestran los productos virales no estructurales, nsp1a, producto de ORF1a, tiene una región que codifica para hélices transmembranales (Tm) (13), un motivo serin proteasa (Prot) y una señal de localización nuclear (NLS). El producto de ORF1b contiene un motivo de ARN polimerasa dependiente de ARN (pol), y se traduce como una poliproteína producto de ORF1a y ORF1b.

ORF2. Está ubicado hacia el extremo 3' del genoma, codifica para la proteína precursora de la cápside del virus y, su traducción es a partir de un ARN subgenómico (ARN_{sg}) que es colineal con el extremo 3' del ARN genómico y que se produce durante el ciclo de replicación (11). El producto de la traducción de ORF2 es una poliproteína de aproximadamente 86-90 kDa(6).

Con base en la homología de la secuencia del ORF2 entre cepas humanas que pertenecen a diferentes serotipos, se ha predicho que el producto primario de este ORF contiene al menos dos dominios. El primero, localizado en el extremo amino de la proteína, es muy conservado (identidades mayores al 81%) y comprende del aminoácido

1 al 415; este dominio incluye dos regiones variables pequeñas que van del residuo 292 al 319 y del 386 al 399. Por su grado de conservación, se piensa que este dominio tiene una función estructural importante. Dentro de esta región conservada, existe una región rica en aminoácidos básicos (principalmente arginina y lisina, entre los residuos del 20 al 71) que se piensa que podría reconocer al ARN viral durante el ensamblaje (18). El segundo dominio, que va del aminoácido 416 hasta el final de la proteína, es muy variable entre los diferentes serotipos con identidades que varían entre 30 y 60%. A pesar de esta variabilidad, en esta región existe un bloque rico de aminoácidos ácidos que está altamente conservado y que parece ser importante para el procesamiento intracelular de la proteína VP90 (26).

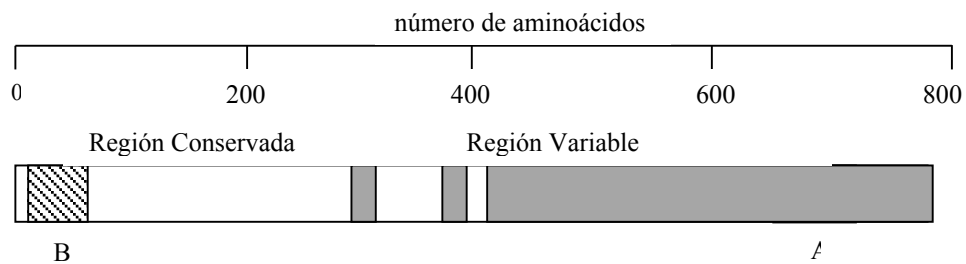


Figura 3. Esquema del producto primario de ORF2. La poliproteína de 90 kDa (VP90); el recuadro abierto muestra la región conservada entre los 8 serotipos, mientras que los recuadros grises representan la región variable. Los cuadros marcados como B y A representan las regiones básica y ácida respectivamente.

Procesamiento Proteolítico

Los ORF1a y ORF1b se traducen simultáneamente produciendo ns1a y ns1ab, productos que posteriormente son procesados para generar proteínas más pequeñas, aunque no se conocen los sitios exactos de procesamiento (30).

Se calcula que las proteínas codificadas por ORF1a y ORF1b tienen pesos de aproximadamente 103 y 160 kDa respectivamente, sin embargo estos productos no han sido encontrados en lisados infectados con Yuc8 (29), lo cual sugiere que el

procesamiento del extremo amino ocurre de forma cotraduccional. Los productos finales de los ORF1a y ORF1b son proteínas de 20, 19, 27 (2 proteínas) y 57 kDa como se muestra en la figura 2. Además se han descrito los productos intermediarios con pesos de 88, 75 y 20 kDa para la proteína nsp1a y de 145 y 85 kDa para la proteína nsp1ab. Utilizando sueros contra un péptido sintético que presenta la región 778 a 792 de nsp1a, se han identificado productos de 21-27 kDa, que parecen estar fosforilados y que podrían participar en la replicación del genoma (13).

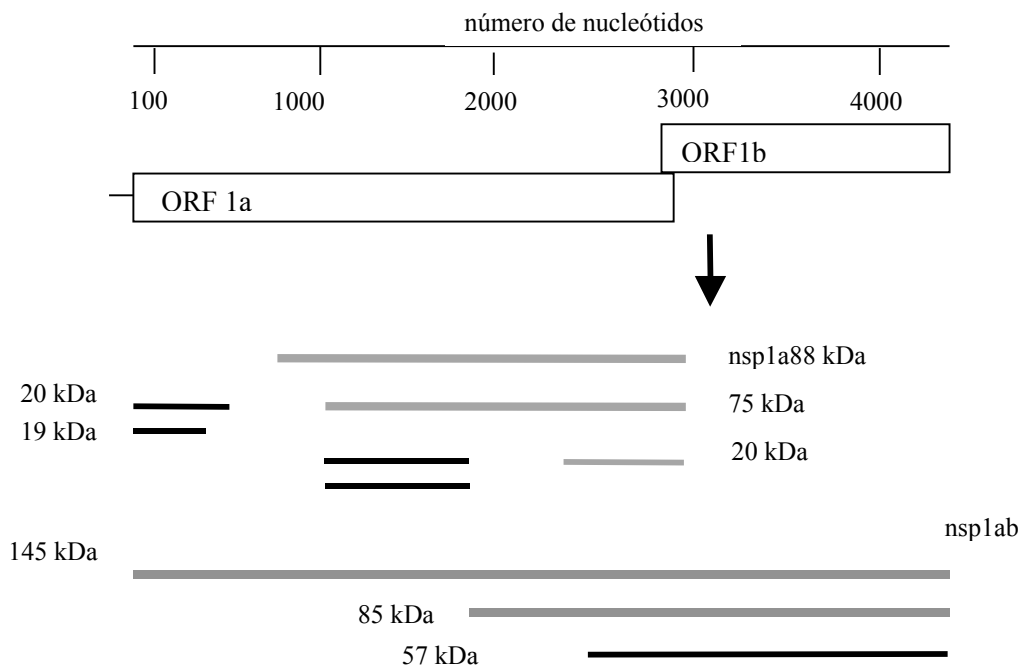


Figura 4. Productos de los ORF1a y ORF1b. Los productos intermediarios codificados por los ORF1a y ORF1b se muestran en gris, mientras que los productos finales están representados en negro.

A partir de la secuencia de ORF2, se predice que el producto primario de su traducción es una poliproteína con un peso molecular entre 86 y 90 kDa. Esta proteína se ha encontrado asociada a células y es susceptible a la digestión por proteasas, procesamiento que resulta en partículas virales infecciosas compuestas por tres proteínas mayoritarias con un tamaño de 35-32 kDa (VP34), 31-27 kDa (VP29) y 26-24

kDa (VP26). La poliproteína de 87-90 kDa se traduce a partir del ARN subgenómico, y se ensambla en el interior de la célula dando lugar a partículas virales con baja infectividad. Para el astrovirus humano serotipo 8, modelo de estudio de nuestro laboratorio, se ha demostrado que la poliproteína de 90 kDa presente en cápsides inmaduras es procesada, a través de cuatro cortes en el extremo carboxilo terminal, por caspasas (28). Este procesamiento intracelular da como resultando la maduración del virus que está compuesto por una proteína de 70 kDa (Figura 5).

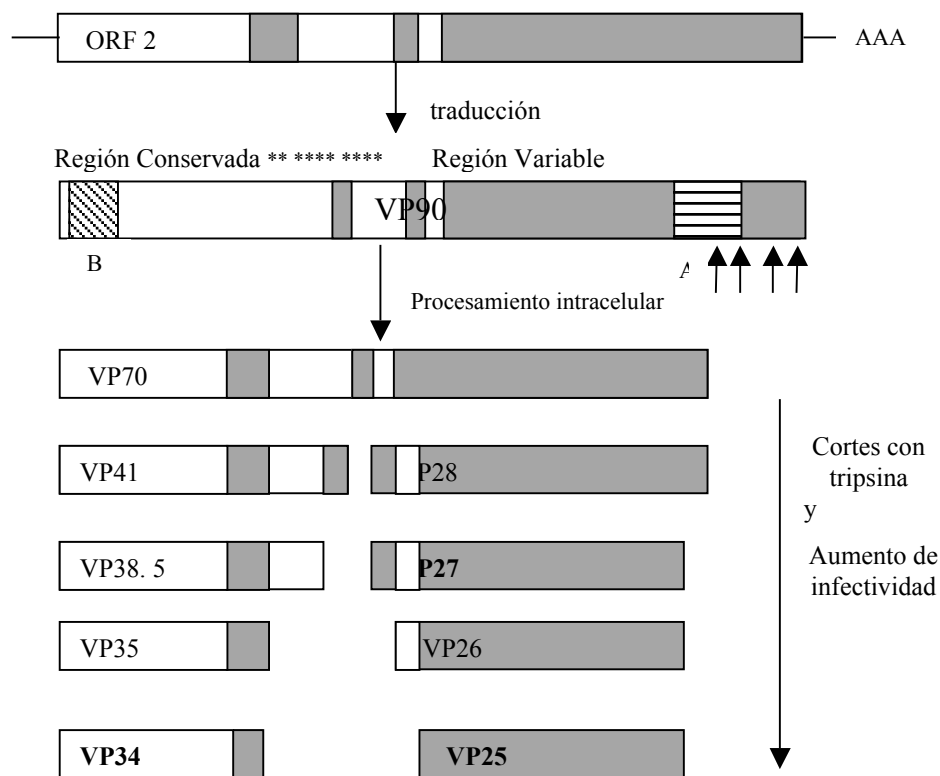


Figura 5. Procesamiento proteolítico del producto primario de ORF2. El producto primario del ORF2 es una proteína de 90 kDa (simbología igual a la figura 3) que sufre procesamiento proteolítico intracelular (flechas hacia arriba) dando lugar a VP70, la cual sufre varios cortes por tripsina dando como resultado una serie de proteínas de menor tamaño. Los posibles cortes por tripsina se señalan con asteriscos (*). Las secciones grises muestran regiones variables, mientras que los cuadros blancos señalan las regiones conservadas a través de los 8 serotipos. Las proteínas finales se muestran con negritas.

Solo las partículas virales que contienen la proteína de 70 kDa en su cápside son liberadas al exterior de la célula. En el medio extracelular, estas partículas son

procesadas por tripsina generando varios intermediarios y como resultado final partículas que contienen proteínas con tamaños de 34, 29 y 26 kDa (VP34, VP27, VP25, respectivamente). Se ha observado que este procesamiento proteolítico es un evento ordenado que resulta en un aumento de la infectividad del virus(6). Aunque se desconoce el mecanismo por el cual aumenta la infectividad, se sabe que el mayor aumento se observa una vez que se han realizado los cortes que dan como resultado la acumulación de los productos finales de VP34, VP27 y VP25. Estos cortes no se dan en un mismo tiempo sino en un evento secuencial; es decir, es necesario que ocurran los primeros cortes para que se produzcan los subsiguientes, sugiriendo que ocurren cambios conformacionales durante la activación de astrovirus, los cuales pueden ser necesarios para un mejor reconocimiento de su receptor o durante la entrada o desencapsidación del virus. Además de lo anterior, se sabe que anticuerpos monoclonales capaces de neutralizar la infección de astrovirus, reconocen las proteínas VP27, VP25 o ambas (2) lo cual hace suponer que estas dos proteínas, productos finales del procesamiento de VP70, son proteínas de la cápside necesarias en las primeras interacciones del virus con su célula huésped, probablemente en la unión.

Estudios de predicción estructural de astrovirus apoyan esta hipótesis. Estos estudios proponen que el dominio variable de VP70 (VP26/VP29) se encuentra involucrado en la interacción con el receptor, mientras que VP34 forma parte de la cápside icosaédrica (Figura 6) (18).

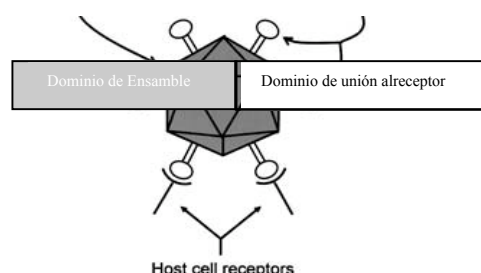


Figura 6. Dominios estructurales propuestos para astrovirus. Con base en predicciones estructurales se propone que la región conservada de VP70 es el dominio de ensamble que forma la cápside viral y encapsida el ARN, mientras que la región variable contiene el dominio de interacción con el receptor específico en la superficie celular. T (sitios de corte por tripsina). C (sitios propuestos de corte para caspasas). (18)

ENTRADA DE VIRUS A LA CÉLULA

La entrada de todos los virus inicia con la unión a la célula y termina con la liberación del genoma en el interior de la célula, en un proceso que involucra importantes cambios conformacionales en las proteínas virales o en los receptores celulares. El primer paso de la entrada es el reconocimiento de la célula huésped a través de receptores en la superficie celular, que pueden ser carbohidratos, proteínas o lípidos. Durante este proceso de adsorción, el virus puede sufrir cambios estructurales y/o inducir eventos de señalización, los cuales son necesarios para la desencapsidación, el tráfico o los eventos de fusión que el virus necesita para su entrada. Después de la unión a la superficie celular los virus pueden ser internalizados mediante dos mecanismos principales:

i) directamente en la membrana plasmática, ya sea mediante la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática o desestabilizándola, o bien ii) pueden entrar después de su internalización, en vesículas, en compartimentos celulares como los endosomas (endocitosis) donde los virus sufren cambios conformacionales que les permiten ser liberados al citosol (39).

Endocitosis

La endocitosis es la principal ruta de entrada de los virus a su célula huésped. En esta ruta los virus inducen la formación de vesículas endocíticas dentro de las cuales son transportados a través de la célula. El tráfico del ligando en estas vesículas depende de las señales que se activan en la célula y pueden resultar en el reciclamiento hacia la membrana celular o en la maduración a lisosomas. Durante la internalización, los endosomas adquieren propiedades temporales y son, por lo tanto, divididos en endosomas tempranos y endosomas tardíos.

Los endosomas tempranos tienen una morfología característica de vesícula tubular (vesículas de más de 1 μ m de diámetro con túbulos conectados de aproximadamente 50 nm de diámetro), y representan el primer punto de control para reciclarse o progresar a endosomas tardíos mediante la acidificación de su interior (de un pH de 6.2-6.5 a 5.6). Recientemente se han reportado a las proteínas EEA1 y Rab 5 como marcadores de endosomas de direccionamiento mientras que la proteína Rab 11 se relaciona con endosomas de reciclamiento. Cuando los endosomas tempranos no se reciclan, maduran para dar lugar a endosomas tardíos, los cuales tienen una morfología más esférica y un pH interior más ácido; además contienen vesículas internas y glicoproteínas de membrana lisosomal e hidrolasas ácidas. La proteína Rab 7 se ha utilizado como marcador de endosomas tardíos. Los lisosomas son el último compartimento de la ruta endocítica, tienen un pH aproximado de 4.8 y por microscopía electrónica aparecen como grandes vacuolas de 1-2 μ m de diámetro, se caracterizan por la presencia de un alto contenido de proteasas e hidrolasas degradativas por lo que generalmente se considera el mayor compartimento hidrolítico de la célula(8). El paso de las partículas virales por el ambiente ácido, los gradientes de protones así como las diferentes

proteasas presentes en los compartimentos mencionados provocan cambios estructurales en el virus, que le permiten penetrar al citoplasma.

Como se mencionó anteriormente la entrada de un virus a la célula mediante endocitosis involucra la participación de un gran número moléculas, de acuerdo a las cuales, la endocitosis se puede dividir, de manera general, en cuatro tipos (Figura 7):

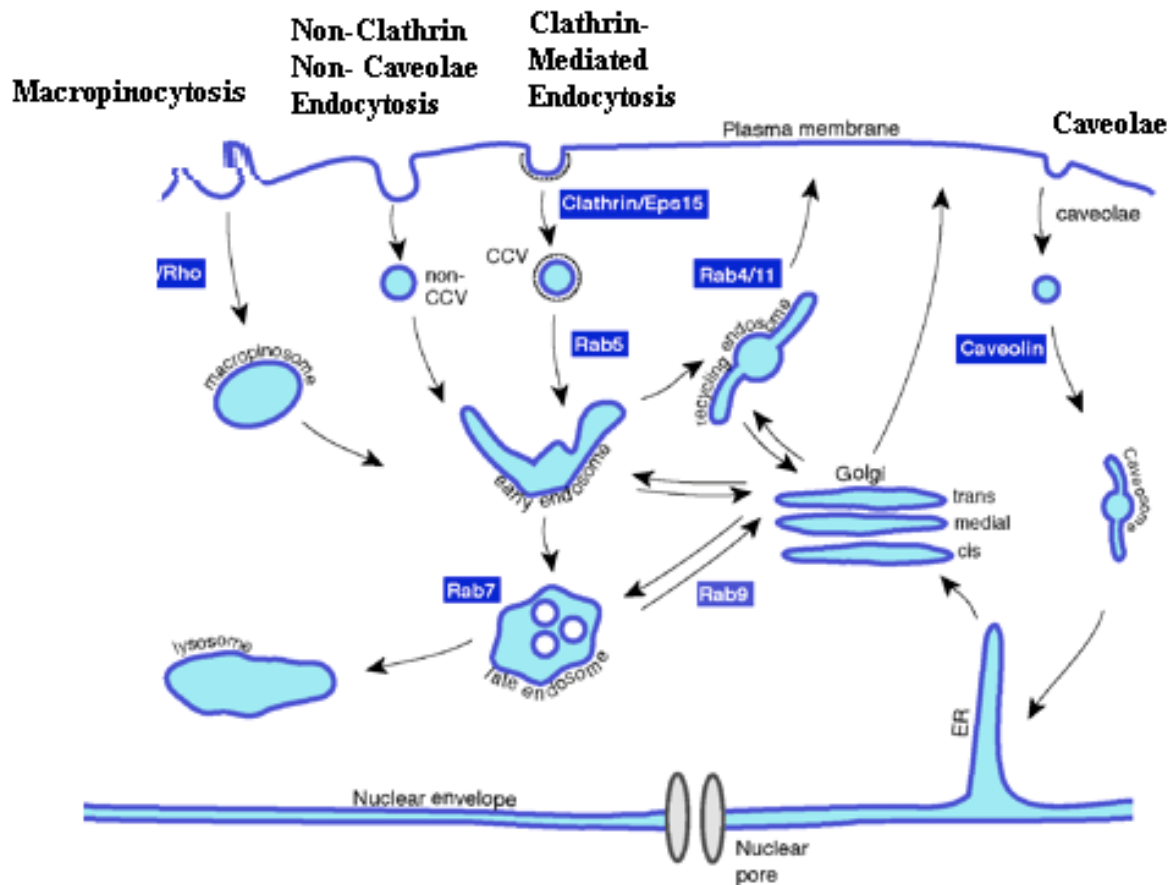


Figura 7. Principales rutas de endocitosis utilizadas por virus. La vía de entrada mejor caracterizada es la endocitosis mediada por clatrina cuyas vesículas requieren entre otras moléculas Eps15 para ser internalizadas. Los virus pueden emplear además la endocitosis dependiente de caveolas, la macropinocitosis o rutas independientes tanto de clatrina como de caveolas, en estas cuatro rutas pueden estar involucrados diferentes organelos de transporte mostrados en la imagen. (43).

1) Endocitosis mediada por clatrina

Cuando las partículas virales se unen a su receptor en la membrana plasmática inducen una cascada de señalización que provoca el reclutamiento de clatrina. La clatrina, a su vez, interacciona con otras moléculas entre las que se incluyen

dinamina, la proteína adaptadora AP-2, Eps15, proteínas de la familia Rab y sus proteínas accesorias. Estas proteínas se unen alrededor de las vesículas para permitir la entrada del ligando a la célula de una forma rápida y eficiente (22).

2) Endocitosis dependiente de caveolina

Esta vía de entrada se caracteriza por la formación de vesículas de aproximadamente 50-80 nm (caveolas), cuyo principal componente es la proteína caveolina, aunque también son ricas en esfingolípidos y colesterol. Las caveolas son microdominios específicos de la membrana plasmática que se endocitan con ayuda de dinamina y actina en un proceso que aunque más lento que la endocitosis mediada por clatrina sigue siendo una ruta de entrada eficiente (14). Las vesículas que son endocitadas no pasan por endosomas, sino que el ligando es liberado en organelos citoplasmáticos pre-existentes llamados caveosomas, ricos en caveolina-1 con un pH neutro, y es dentro de estas entidades que la molécula cargo es transportada en el interior de la célula.

3) Macropinocitosis

La macropinocitosis se ha considerado generalmente un mecanismo no específico de internalización, ya que no depende de la unión del ligando a un receptor. Sin embargo se ha visto que la formación de vesículas endocíticas ocurre como respuesta a una estimulación celular en los sitios en que se alarga la membrana plasmática para formar vesículas irregulares de gran tamaño llamadas macropinosomas a través de un proceso dependiente de actina pero independiente de dinamina(8, 14). Estos macropinosomas pueden acidificarse e insertarse en

vesículas endocíticas, lo cual hace de la macropinocitosis una posible ruta de entrada para una amplia variedad de virus.

4) Endocitosis independiente de clatrina y de caveolina

Aunque las vías de entrada mejor caracterizadas son dependientes de clatrina o de caveolina, algunos virus no utilizan ninguna de las dos, sin embargo comparten una o varias características de una u otra vía tales como el uso de dinamina, de microdominios resistentes a detergentes en la membrana plasmática, de la liberación en endosomas tardíos o en lisosomas (43). Esto ha ocasionado que no se pueda clasificar en una de las rutas descritas anteriormente.

La entrada de virus a través de endocitosis mediada por clatrina requiere la participación de una serie de moléculas tales como Eps15, epsin, AP-2 que permiten la internalización del receptor con su ligando. Para este reconocimiento el receptor debe contener en su dominio citosólico secuencias de aminoácidos específicas que sean reconocidas por estas moléculas, que permiten el reclutamiento de clatrina, la liberación de las vesículas de la membrana y el transporte de estas vesículas hacia el sitio correspondiente (40). Una de las proteínas adaptadoras que interacciona directamente con clatrina se denomina AP2 a la cual se unen, entre otras moléculas, epsin y Eps15. Esta última proteína tiene una estructura dividida en tres partes que comprenden: la región amino terminal, la cual contiene tres repeticiones imperfectas de 70 aminoácido homólogos entre sí y con otros dominios, encontrados en proteínas de diferentes especies, denominado dominio homólogo de Eps15 (EH); la región central de la proteína contiene repeticiones héptadas mostrando una gran propensión a formar

estructura coiled-coil, lo que permite la oligomerización de Eps 15 para formar tetrámeros y la región carboxilo terminal se caracteriza por la presencia de múltiples repeticiones DPF (aspartato, prolina, fenilalanina). Es esta última región de Eps15 la que se une a AP2 y además contiene dominios de interacción con ubiquitina. Durante la endocitosis mediada por clatrina de diferentes receptores se ha visto la necesidad de la ubiquitinación como señal para la internalización(7, 9, 40). Generalmente la poliubiquitinación de una proteína conduce a su degradación por vía del proteasoma, mientras que la mono-ubiquitinación de proteínas membranales es importante para su internalización durante la endocitosis, o el transporte vesicular en la célula.

De forma general la ubiquitinación implica la unión de ubiquitina (péptido de 76 aminoácidos) a residuos específicos de lisina en tres pasos : primero se requiere que una enzima E1 active la ubiquitina en una reacción dependiente de ATP formando un enlace tioéster en la cisteína de su sitio activo con el COOH-terminal de la ubiquitina; posteriormente la ubiquitina es transferida a la cisteína del sitio activo de la enzima conjugadora de ubiquitina E2 y después en algunas ocasiones la ubiquitina es transferida a la cisteína del sitio activo de E3 (ubiquitin-ligasa). En la última reacción, catalizada por E2 con ayuda de E3 o directamente por E3, se forma un enlace entre el carboxilo terminal de una glicina de la ubiquitina con el grupo amino- de un residuo de lisina de la proteína blanco (7, 9, 36, 40).

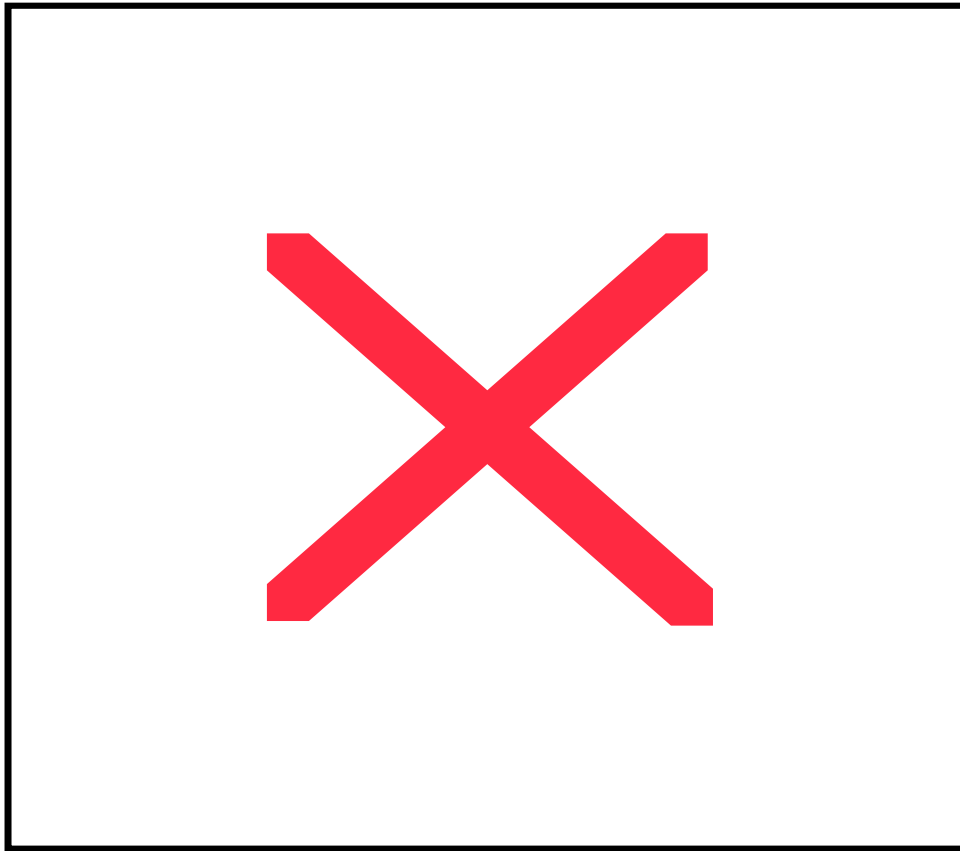
En el caso de la entrada de virus se sabe que inhibidores de proteasoma, que limitan la disponibilidad de ubiquitina libre en la célula, bloquean la infectividad de algunos virus (Ej. Virus de Hepatitis de ratón e Influenza) que entran por endocitosis y que requieren ser direccionados a distintos organelos de la ruta endocítica dentro de la célula(17, 44). Se sabe de una gran cantidad de receptores, cuya internalización vía endocitosis

dependiente de clatrina está determinada por su ubiquitinación(7, 9, 40). Asimismo, recientemente se ha descrito que algunos virus que penetran a la célula por endocitosis dependiente de clatrina requieren que el proceso de ubiquitinación se encuentre inalterado (14, 33) para establecer una infección productiva.

Estudios realizados con astrovirus en células de riñón de embrión humano (HEK-293) sugieren que el virus entra por endocitosis mediada por clatrina, sin embargo tales estudios son limitados y no permiten conocer en qué estadíos de la vía endocítica, los virus penetran en la célula.

Estudios más recientes y completos con otra cepa de astrovirus humano, utilizando algunos marcadores para diferentes vías de endocitosis (Tabla1), han permitido sugerir que su entrada a células Caco-2, derivadas de un carcinoma de colon humano y por lo tanto más parecido a las células blanco naturales, es dependiente de la endocitosis mediada por clatrina.

Tabla 1. Criterios de clasificación de las diferentes rutas endocíticas (30).



(+) Grado de especificidad de cada inhibidor para clasificar una vía.

Así, drogas que bloquean este tipo de endocitosis, tales como Clorpromacina, Brefeldina A, Dansilcadaverina, Bafilomicina-A1, y la expresión de proteínas que actúan como dominantes negativas de Eps 15 y dinamina, bloquean la infección de astrovirus. Sin embargo, existen datos que no concuerdan ya que dos agentes que bloquean la acidificación de endosomas (Bafilomicina-A1 y NH_4Cl), tienen efectos contrarios sobre la infectividad de astrovirus en estas células. El pH puede ser un estímulo para que se generen los cambios estructurales necesarios en el virus que conduzcan a su entrada a la célula, por lo que un estudio más profundo sobre la necesidad de la acidificación del endosoma para que se establezca una infección

productiva es importante para un mejor conocimiento del proceso de entrada de
astrovirus.

JUSTIFICACIÓN

Algunos resultados en el laboratorio, sugieren que los astrovirus entran por una vía de endocitosis mediada por clatrina, en células Caco-2. Sin embargo no es clara la necesidad de la acidificación del endosoma para este evento. Algunos virus que entran por esta ruta como influenza, rinovirus, hepatitis C, hepatitis B de pato, virus infeccioso de anemia, virus de estomatitis vesicular y virus herpes simplex, requieren del pH ácido endosomal para sufrir cambios estructurales que les permite separarse de su receptor y/o exponer regiones previamente inaccesibles que facilitan su liberación de los endosomas al citoplasma celular. En el caso de la cepa Yuc8 de astrovirus, el pH ácido intravesicular podría ser un estímulo que ocasione cambios conformacionales que faciliten la liberación del ARN genómico en el interior de la célula. La caracterización de la dependencia de pH ácido, para una infección exitosa, permitirá conocer mejor el proceso de entrada de astrovirus, que hasta el momento ha sido poco estudiado.

Por otro lado, los estudios realizados en el laboratorio con las proteínas dominantes negativas de Eps 15 y dinamina, sugieren que, al igual que otros virus que entran por endocitosis mediada por clatrina, la infección de astrovirus podría requerir de la ubiquitinación de moléculas celulares durante la entrada. En el caso de astrovirus, no se conocen todas las moléculas involucradas en la entrada y direccionamiento de las partículas virales, por lo que el estudio sobre la participación de la ubiquitina en los primeros pasos de la infección puede contribuir a tal conocimiento.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los eventos tempranos de la infección de astrovirus humanoserotipo 8 con la célula huésped (células Caco-2).

Objetivos Particulares

- 1) Determinar la cinética de unión de partículas infecciosas de astrovirus a células Caco-2.
- 2) Estudiar el efecto de drogas que bloquean la endocitosis dependiente de clatrina.
- 3) Evaluar posibles cambios estructurales del virus asociados con cambios en el pH.
- 4) Evaluar el efecto de pH ácido en la entrada de astrovirus a células Caco-2.
- 5) Estudiar el posible papel de la ubiquitinación en la internalización del virus.

HIPÓTESIS

El pH ácido puede promover cambios conformacionales sobre las proteínas estructurales de astrovirus humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células.

Se utilizó una línea celular de un carcinoma de colon humano, denominadas Caco-2, obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). Se cultivaron monocapas de esta línea celular, bajo una atmósfera de 10% de CO₂ a 37°C con Medio Advanced Dulbecco Modificado de sales de Eagle (Adv. DMEM) con 2% suero fetal bovino.

Virus.

Se utilizó una cepa de astrovirus humano serotipo 8 denominada Yuc8, que previamente había sido adaptada a crecer en células Caco-2. Para la propagación del virus, las células Caco-2, crecidas en monocapa en frascos con una superficie de 162 cm² se infectaron con Yuc8, previamente tratado con 200 μ g de tripsina/ml, a una multiplicidad de infección de 1 ffu/ml (unidad formadora de focos por mililitro) durante 1 hora a 37°C. Se removió el inóculo y las células infectadas se incubaron a 37°C durante 22-24 horas con Medio Mínimo Esencial (sales de Eagle) (6). El virus se cosechó por congelación-descongelación de las células infectadas. El virus se utilizó en los pases 30 y 31.

Tiempo de unión

Se infectaron monocapas de células Caco-2 con Yuc8 a una m.o.i. (multiplicidad de infección) de 0.01 ffu/ml en cajas multipozos de 24 pozos a 4°C. A diferentes tiempos, el virus fue diluido con 1 ml de medio, se retiró y agregó medio precalentado. La infección se dejó continuar a 37°C durante 16 horas para evaluar el número de células infectadas por inmunotinción con peroxidasa y, por lo tanto, de partículas virales infecciosas que fueron capaces de unirse a los tiempos mencionados. Para evaluar la

cinética de unión, se consideró el número de partículas presentes en el inóculo y el número de partículas que se adsorbieron a cada tiempo, con estos valores se calculó el tiempo medio de unión, usando las ecuaciones descritas en Resultados y Discusión.

Efecto de agentes que afectan endocitosis sobre la infectividad de astrovirus

Se usó Bafilomicina-A1 (0.5 μ M) y Cloruro de amonio (50 mM) (inhibidores de la acidificación de endosomas), Clorpromacina (20 μ g/ml) (impide el reclutamiento de clatrina), MG132 (10 μ M) (inhibidor de la actividad tipo quimi tripsina del proteasoma de ubiquitina), CA-074 (0.5 mM) (inhibidor de catepsina B) y Z-Phe-Phe-fluorometilcetona (Z-FFF-FMK) (0.1 mM) (inhibidor de catepsina L), utilizando diluciones 1:2 a partir de la concentración mencionada para cada una de ellas. Todas las drogas fueron obtenidas de Sigma-Aldrich, excepto el inhibidor de catepsina L que fue obtenido de Calbiochem. Las soluciones concentradas de las drogas fueron diluidas en dimetil sulfóxido, excepto para Cloruro de amonio que se preparó en MEM sin suero y se esterilizó a través de un filtro 0.22 μ m de poro para cada ocasión.

Para probar el efecto de las drogas sobre la infección de Yuc8, las células contenidas en cajas multipozos de 96 pozos fueron tratadas 1 hora a 37°C antes y durante la infección. La infección se realizó con un número conocido de partículas virales, de manera que se cuantificó el porcentaje de células infectadas en presencia de la droga. Después de retirar el inóculo, las células fueron lavadas con MEM sin suero, y se dejó continuar la infección 18 horas. Las células infectadas fueron detectadas por inmunotinción con peroxidasa.

Determinación por ELISA de cambios promovidos por pH en Yuc8

Sobrenadante de lisado de virus Yuc8 crecido en presencia de TRAIL (un inductor de apoptosis y que por lo tanto promueve el corte de VP90 a VP70 por caspasas) o células de lisado de Yuc8 crecido en presencia de zVAD (un inhibidor de caspasas y que en consecuencia evita el procesamiento de VP90 a VP70) se trató con o sin tripsina (200 μ g/ml) durante 1hr a 37°C. Después se diluyó 5 veces en HEPES pH 7 ó 5 y se incubó por 30 minutos a 37°C. En una placa de ELISA (Costar 3791) se colocaron 50 μ l de cada una de estas muestras en 8 pozos diferentes, una por columna. La placa se incubó 1 hora a 37°C. Posteriormente se bloqueó incubando 1 hora a 37°C con 200 μ l de BSA 1% en PBS ($\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$) (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.115% Na_2HPO_4 , 0.024% KH_2PO_4 , 0.01% CaCl_2 , 0.01% MgCl_2 ; pH 7.4), después se agregaron 50 μ l de los anticuerpos diluidos en HEPES pH 7 y 5 contra: TYVD (residuos 652-681 de VP90), SHFAR (residuos 295-313), E1C89 (residuos 2-208), E2 (residuos 209-342), E3 (residuos 386-504) y anti Yuc8 (generado contra virus formado por VP70), todos a una dilución 1:1000, se incubó la placa 1 hora a 37°C. Después de este tiempo se agregaron 50 μ l del anticuerpo anti-inmunoglobulinas de conejo marcado con fosfatasa alcalina, y se incubó nuevamente a 1 hora a 37°C. Entre cada incubación los pozos fueron lavados cuatro veces con 150 μ l de PBS ($\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$). Finalmente se agregó el sustrato de fosfatasa alcalina (SIGMA SO942), preparado diluyendo una pastilla de 5 mg en 5 ml de dietanolamina pH 7.9. Las placas se incubaron a 37°C hasta ver coloración y se leyó la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro de placa (BIO-TEK INSTRUMENTS EL311).

Efecto de pH ácido en la entrada de Yuc8

Las partículas virales fueron tratadas antes o durante la infección con MEM sin suero a pH 7 y 5. El pH del medio fue ajustado con una solución de ácido cítrico (15 mM ácido cítrico y 150 mM NaCl), y éste se esterilizó por filtración a través de un poro de 0.22 μ m de diámetro. Cuando se usaron drogas en estos experimentos también fueron diluidas en medio pH 7 o pH 5 según el caso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Velocidad de unión de Yuc8

Con el objetivo de caracterizar las primeras interacciones de astrovirus humano con la célula huésped realizamos experimentos de unión a células Caco-2 para determinar la velocidad de unión de la cepa Yuc8 de astrovirus. En las condiciones utilizadas, se aseguró que el virus se encontrara en cantidad limitante sobre monocapas de células Caco-2. La adsorción del virus a la célula se evaluó por incubación a 4°C, temperatura a la que se une el virus pero no penetra a la célula, por periodos cortos de tiempo; al final de cada tiempo el virus se diluyó, el inóculo se retiró y se agregó medio, incubando a 37°C. Después de 16 horas, se determinó el número de células infectadas y por tanto el número de partículas infecciosas que se pegaron a los tiempos utilizados. Bajo estas condiciones de interacción, la unión solo depende de la cantidad de virus, ya que existe una cantidad excesiva del receptor, y por tanto, se estableció una reacción de primer orden (27), regida por la ecuación:

$$\ln (V_0/V_t) = (KC)t,$$

Donde V_0 es la cantidad total de partículas infecciosas que se agregaron (en el caso de este experimento V_0 se consideró como la cantidad de virus pegado en 60 minutos, ya que la cantidad de virus que se pega después de este tiempo es despreciable) a 2×10^5 células (C) y V_t es el virus no pegado en un periodo de tiempo (t). K representa la constante de velocidad de formación del complejo virus-célula, la cual se calculó a partir de la pendiente ($m = KC$) de la regresión lineal de la curva. El virus infeccioso no

pegado a diferentes tiempos fue calculado como el virus infeccioso total agregado, menos el virus infeccioso determinado a diferentes tiempos, calculado como la cantidad de células infectadas. Se confirmó que se trataba de una reacción de primer orden, por la gráfica obtenida (Fig. 8), y en base a la ecuación de la gráfica, se determinó el tiempo medio de pegado:

$$t_{1/2} = 0.693/k,$$

donde k es el producto de KC y representa la pendiente de la recta.

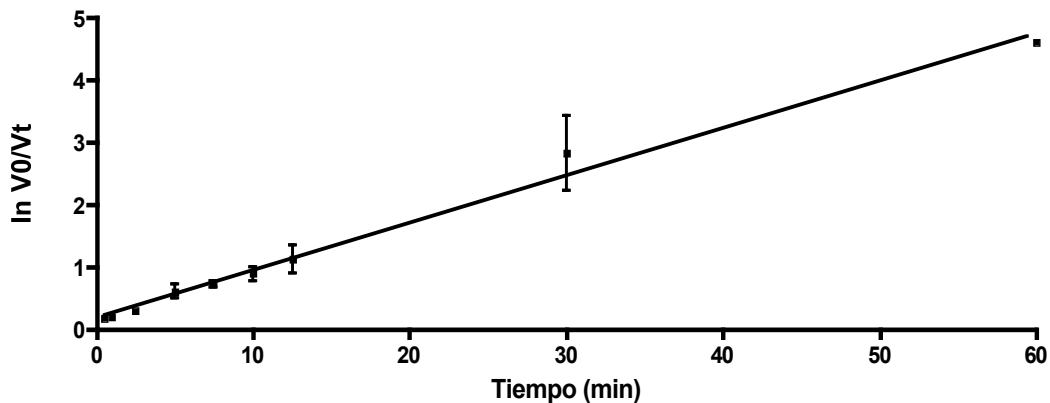


Figura 8. Cinética de pegado de Yuc8. Monocapas completas de células Caco-2 fueron infectadas con virus Yuc8 a una m.o.i de 0.01 a 4°C. A los tiempos indicados se lavó la monocapa con MEM a 4°C para retirar las partículas no pegadas. Las células fueron cambiadas a 37°C para permitir la infección durante 18 horas después de las cuales las células infectadas fueron analizadas por inmunotinción. Se muestran los resultados de 5 experimentos por triplicado.

Se determinó que el tiempo medio de pegado de partículas infecciosas de Yuc8 a células Caco-2 fue de 9.44 min. Los virus como rinovirus equino, virus de fiebre aftosa (FMDV), mengovirus, virus de encefalomiocarditis (3), algunas cepas de rotavirus como nar 3 (27) tienen un tiempo medio de pegado de aproximadamente 15 minutos mientras que una cepa humana de rotavirus (Wa) lo tiene de hasta 38 minutos (26) en la célula huésped correspondiente. Comparado con esos virus Yuc8 tiene un tiempo medio de pegado corto aunque existen virus que requieren aun de menor tiempo para pegarse a

la célula como YM o DS1xRRV, cepas de rotavirus de origen animal, que requieren 6 y 5 minutos respectivamente (3). Con los resultados obtenidos fue posible determinar que el 85% de las partículas virales infecciosas, se pegan en los primeros 30 minutos de la infección, lo cual nos fue de utilidad para determinar los tiempos en los que se llevarían a cabo los siguientes experimentos. Además de la cinética de unión del virus, en este trabajo se quiso evaluar la posible participación del pH ácido durante la entrada de Yuc8, para lo cual se hicieron los siguientes experimentos.

Efecto de diferentes drogas sobre la infección por Yuc8

Debido a las diferencias previamente obtenidas en el laboratorio respecto a la dependencia del medio ácido de los endosomas para establecer una infección productiva con astrovirus, decidimos confirmar el efecto de las drogas Clorpromacina, Bafilomicina-A1 y el NH_4Cl , sobre la infectividad de la cepa Yuc8. Las drogas empleadas afectan la endocitosis mediada por clatrina a diferentes niveles. La Clorpromacina evita el ensamble de clatrina evitando la formación de vesículas endocíticas, mientras que la Bafilomicina-A1 y el NH_4Cl bloquean la acidificación de endosomas, aunque en diferente forma. La Bafilomicina-A1 bloquea una bomba de protones dependiente de ATP en la membrana endosomal impidiendo así la acidificación de su interior, mientras que el NH_4Cl es una base débil, permeable a la membrana y por tanto puede entrar al endosoma aumentando su pH (4, 21). En estos experimentos, monocapas de células Caco-2 fueron tratadas con las diferentes drogas en diluciones dobles seriadas por 1 hora a 37°C , después de lo cual fueron infectadas con Yuc8 a una m.o.i de 0.03 ffu/ml en presencia de las drogas, se retiró el inóculo y se dejó continuar la infección por 18 horas a 37°C . Los resultados se expresaron como el

porcentaje de células infectadas evaluado por inmunotinción con peroxidasa, considerando el 100 % como el número de células infectadas encontradas en ausencia de droga (Fig. 9).

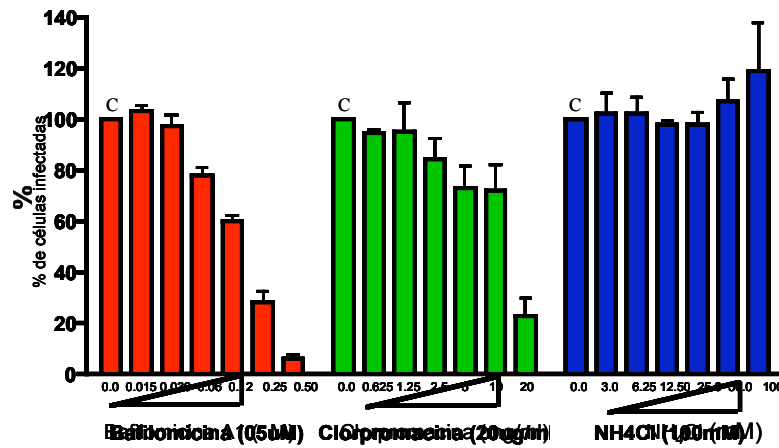


Figura 9. Efecto de diferentes drogas sobre la infectividad de Yuc8. Para evaluar el efecto de las diferentes drogas utilizadas se probaron en diferentes diluciones sobre células Caco-2 1hr a 37°C (NH₄Cl solo 30 min (37)) antes y durante la infección (m.o.i de 0.03 ffu/ml). Se consideró como 100% las células infectadas en ausencia de droga para cada caso. Se muestran los resultados obtenidos en 5 experimentos por duplicado.

Como se observa en la figura 9, tanto la Bafilomicina-A1 como la Clorpromacina tienen un claro efecto inhibitorio sobre la infectividad de Yuc8, a diferencia del NH₄Cl que no bloquea la infección. Los resultados obtenidos con la Bafilomicina-A1 sugieren que el pH ácido de los endosomas es importante, sin embargo esto no puede asegurarse debido al comportamiento contradictorio del NH₄Cl. Para comprobar que el NH₄Cl sí afectaba la acidificación de los endosomas en estas células, se utilizó reovirus como control, contra el cual ambas drogas tienen un efecto inhibitorio. El experimento se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas anteriormente (Fig. 10 y 11).

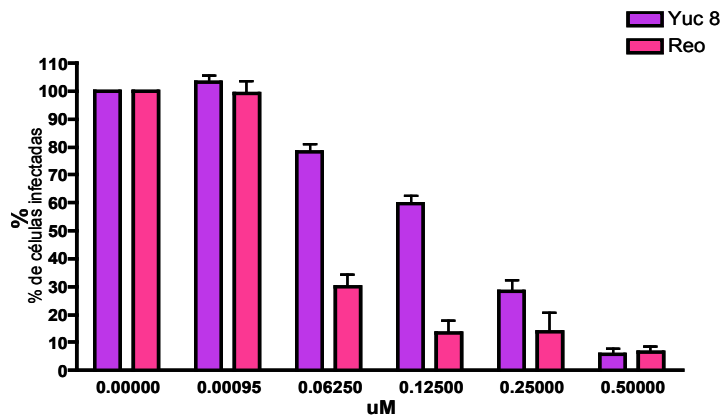


Figura 10. Efecto inhibitorio de Bafilomicina-A1 sobre la infectividad de Yuc8 y reovirus. Se probó Bafilomicina-A1 en diluciones dobles seriadas a partir de 0.5 μ M sobre la infectividad de reovirus (m.o.i 0.02) y Yuc8 (m.o.i 0.03). Las células fueron tratadas con la droga durante 1hr antes y durante la infección. El número de células infectadas en ausencia de droga para cada virus se consideró como el 100%. La gráfica muestra los resultados de 3 experimentos por duplicado.

Como se observa en las figuras 10 y 11, tanto la Bafilomicina-A1 como el NH_4Cl tienen un claro efecto inhibitorio sobre reovirus, aunque como se determinó antes, solo la Bafilomicina-A1 afecta la infectividad de astrovirus.

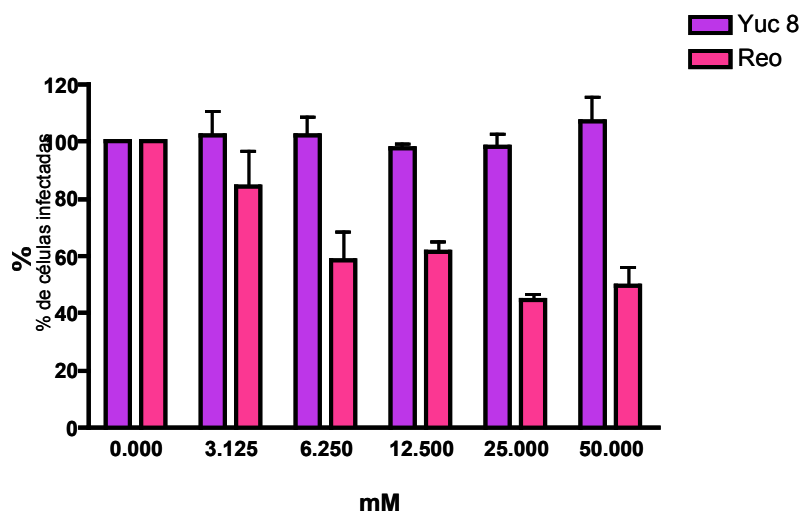


Figura 11. Efecto del NH_4Cl sobre la infectividad de Yuc8 y reovirus. Se probó el efecto del NH_4Cl sobre la infectividad de reovirus y Yuc8 de la misma forma que Bafilomicina-A1. Las células fueron tratadas con diluciones dobles seriadas de droga 30 min. antes y durante la infección. Se consideró como 100% para cada virus el número de células infectadas en ausencia de droga. Se muestran los resultados de 3 experimentos realizados por duplicado.

Aunque el NH_4Cl tiene un efecto inhibitorio sobre reovirus, su infectividad no se reduce a más del 50%, lo que contrasta con previos resultados en células L, en donde se reduce hasta en un 80%, con una concentración cinco veces menor que la más alta aquí

utilizada (21). Esta diferencia podría deberse a varios factores, incluyendo la línea celular y la cepa de reovirus utilizada. En otros virus cuya entrada es dependiente de pH, como poliomavirus (19), virus infeccioso de bronquitis (6), hepatitis C (41), rinovirus (32), herpes simple (31), y virus de anemia equina (16) se ha observado un efecto negativo sobre la infectividad tanto por NH_4Cl como por Bafilomicina-A1. Con base en estos resultados no pudimos concluir que el pH ácido del endosoma fuera necesario durante la infección de Yuc8. En caso de ser necesaria la acidificación del endosoma para la infección de Yuc8, ésta podría influir a dos niveles: 1) activando enzimas endosomales posiblemente necesarias en la desencapsidación del virus o 2) directamente sobre el virus provocando cambios estructurales que conduzcan a esa desencapsidación.

Participación de catepsinas durante la entrada

Para evaluar la hipótesis de que la activación de enzimas endosomales es necesaria para la infección con astrovirus, evaluamos el papel de inhibidores de algunas de estas proteasas sobre la infectividad de Yuc8. Debido a que se ha visto que las catepsinas B y L son importantes para establecer la infección de otros virus, como virus infeccioso de bronquitis, reovirus, virus de Ebola, que también dependen del pH ácido de los endosomas (5, 10, 33, 38), utilizamos inhibidores específicos contra estas enzimas. Las condiciones del experimento fueron similares a las descritas anteriormente para las otras drogas. Se utilizó reovirus como control del tratamiento con catepsina L, ya que este virus requiere la actividad de esta proteasa para sufrir los cambios que le permiten salir del endosoma; sin embargo no contamos con controles positivos que nos revelen la actividad de catepsina B.

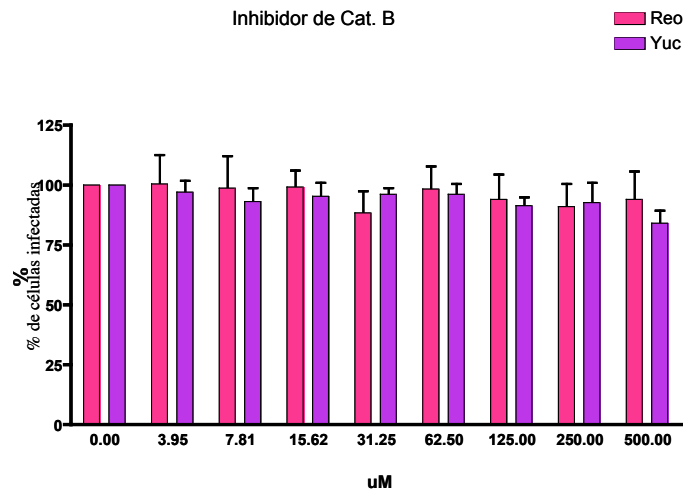


Figura 12. Efecto del inhibidor de catepsina B (CA-074) sobre la infectividad de Yuc8 y reovirus. Células Caco-2 fueron tratadas 1hr antes, durante y 1hr después de la infección con un inhibidor específico de catepsina B. Los resultados se expresan como porcentaje de células infectadas referidas a la condición sin droga como el 100%. La gráfica muestra los resultados de 4 experimentos por duplicado.

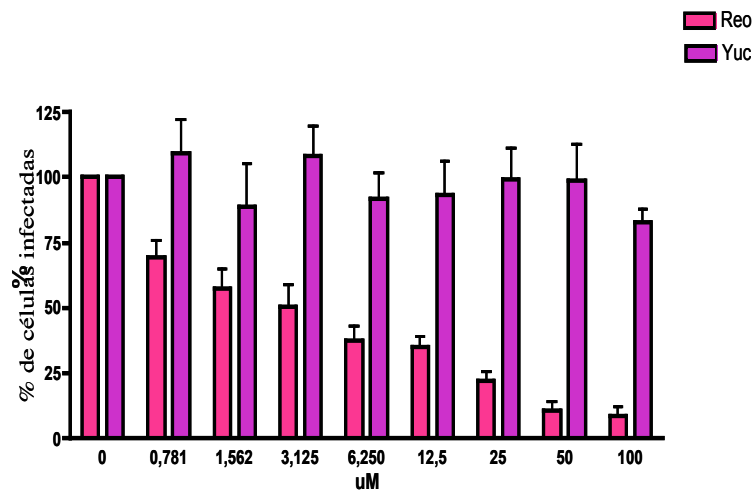


Figura 13. Efecto del inhibidor de catepsina L (Z-FF-FMK) sobre la infectividad de Yuc8 y reovirus. Se trataron células Caco-2 con el inhibidor 1hr antes, durante y 1 hr después de la infección. Los resultados se expresan como porcentaje de células infectadas referidas a la condición sin droga como el 100%. La gráfica muestra los resultados de 3 experimentos por duplicado.

Los resultados en la figuras 12 y 13 muestran que la actividad de las catepsinas B y L no es necesaria para la entrada de Yuc8 a la célula, ya que ninguno de los inhibidores tiene un efecto sobre la infectividad de este virus. Sin embargo, como se mencionó antes, no podemos asegurar el papel de la catepsina B sobre astrovirus, ya que no contamos con un control de catepsina B, por lo que los resultados con esta enzima requieren una posterior validación.

Cambios en la reactividad con anticuerpos por pH ácido

Para evaluar la hipótesis de posibles cambios estructurales promovidos por el pH ácido sobre las partículas virales, se probó la reactividad de Yuc8 con diferentes anticuerpos a pH 7 ó 5. Para llevar a cabo este experimento, utilizamos preparaciones enriquecidas en partículas que contuvieran a las proteínas VP70 o VP90, con el fin de encontrar condiciones en las que los cambios fueran más notables. Debido a que el corte de VP90 a VP70 y, por lo tanto la liberación de partículas virales se puede modular por la activación de caspasas (28), se infectaron células en presencia de TRAIL o zVAD (inductor o inhibidor de caspasas respectivamente). Se recuperó el sobrenadante de las células infectadas en presencia de TRAIL, como fuente de partículas que contienen VP70, o la fracción celular de las células infectadas en presencia de zVAD, como fuente de partículas enriquecidas en VP90, debido a que estos agentes promueven o bloquean el corte por caspasas, respectivamente. Cada una de estas fracciones se trató con tripsina (200 μ g/ml) y después se incubaron a pH 7 ó 5 durante 30 minutos a 37°C, al cabo de los cuales se adsorbieron a placas de ELISA para probar su reactividad con anticuerpos contra los siguientes péptidos: CQFG (que incluye los residuos 121 a 150 de VP90), TYVD (residuos 652-681) y SHFAR (residuos 295-313) y, contra la proteína recombinante E1 (residuos 3-208) y contra la partícula viral (anti-Yuc8), cuya posición relativa se muestra en la figura 14.

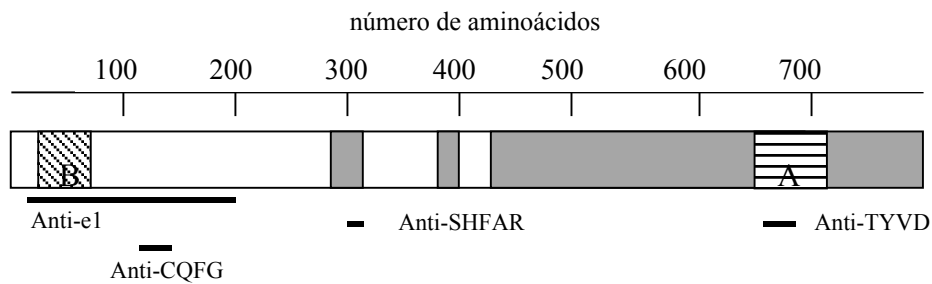


Figura 14. Péptidos derivados de VP90 utilizados para generar anticuerpos. La posición relativa de los péptidos se representa como líneas negras. Las diferentes regiones de VP90 están representadas igual que en la figura 3.

Como se observa en la figura 15, la reactividad de algunos anticuerpos se ve afectada por el tratamiento con tripsina más que por cambios en el pH (Por ej. virus que contienen VP90 con el suero anti-TYVD); mientras que en otros casos el pH sí parece afectar la reactividad (Por ej. virus que contiene VP70 con el suero anti-CQFG), aunque en general los cambios no son muy drásticos. Sin embargo, el anticuerpo dirigido contra el péptido que contiene los residuos 3-208 (ani-e1) de VP90, cambia drásticamente su reactividad contra VP70 o VP90, cuando estas partículas se someten a pH ácido, independientemente de que sean tratadas con tripsina, sugiriendo que el pH ácido, por sí mismo puede promover cambios estructurales en las partículas virales. Debido a que este anticuerpo está dirigido contra la región amino-terminal de la proteína, que es muy conservada, se piensa que el tratamiento con pH ácido puede permitir la exposición de epítopos dentro de esta región de VP90 que antes no estaban expuestos, lo que podría formar parte del desnudamiento del virus durante su entrada. Estos resultados indican que el pH ácido puede propiciar cambios estructurales en el virus, sin embargo no permiten asegurar que estos cambios sean funcionales durante el proceso de entrada del virus.

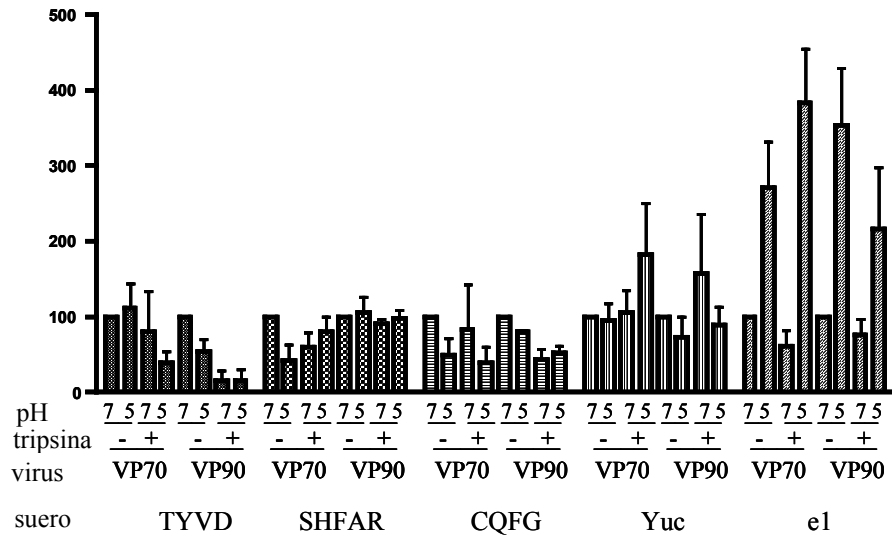


Figura 15. Cambios de reactividad de Yuc8 por pH con sueros contra péptidos. Sobrenadante de lisado producido en presencia de TRAIL (VP70) y fracción celular de lisado producido en presencia de zVAD (VP90) fueron procesados con tripsina y después sometidos a pH 7 ó 5. Con cada condición se hizo prueba de ELISA con diferentes anticuerpos. Se consideró como 100% la condición sin tripsina a pH 7 para cada grupo de VP70 o VP90. Se muestran los resultados de por lo menos 3 experimentos por duplicado.

Efecto del pH ácido sobre el virus

Para evaluar la funcionalidad de los posibles cambios estructurales de Yuc8 debido al tratamiento con pH ácido durante su entrada, la infección se llevó a cabo con virus previamente tratado con pH ácido; además, la infección se realizó en presencia de drogas que bloquean la endocitosis dependiente de clatrina, para saber si este virus con posibles cambios debidos al tratamiento con pH ácido no requería más de este tipo de endocitosis. El razonamiento fue que el tratamiento con pH ácido podría promover los cambios necesarios que de manera natural se dan en los virus dentro de los endosomas, permitiendo al virus entrar a la célula sin pasar por la ruta endocítica y por lo tanto evadir el efecto inhibitorio de las drogas. En estos experimentos Yuc8, activado con tripsina, se incubó con medio a pH 7 o pH 5 durante 30 minutos a 37°C, se adsorbió sobre células Caco-2 previamente tratadas con Bafilomicina-A1 (0.25 μ M) o con Clorpromacina (20 μ g/ml) y la infección se llevó a cabo a pH 5 o pH 7 en presencia de las drogas.

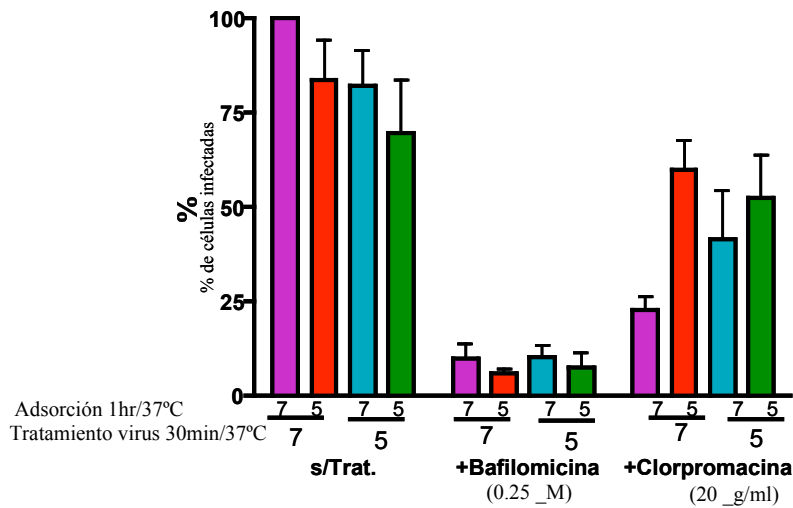


Figura 16. Efecto del pretratamiento de Yuc8 con pH ácido sobre su infectividad. Se infectaron monocapas de células Caco-2 a diferentes pHs con virus previamente tratado a pH 7 ó 5, tanto el tratamiento del virus como la adsorción se realizaron a 37°C. El número de células infectadas con virus tratado y adsorbido pH 7 se consideró como el 100 % al cual se refieren todos los resultados. La gráfica muestra los resultados de 3 experimentos realizados por duplicado.

El tratamiento del virus con pH ácido no afecta la sensibilidad del virus al tratamiento de las células con Bafilomicina-A1, ya que bajo cualquier condición de pH, la infectividad en células tratadas con esta droga fue similar. Sin embargo, como se observa en la figura 16, cuando la infección se hizo en presencia de Clorpromacina, el tratamiento y/o adsorción del virus con pH ácido promovió una recuperación parcial de su infectividad. Es importante mencionar que el tratamiento con pH ácido disminuyó ligeramente la infectividad sobre células sin tratamiento. Estos datos sugieren que el tratamiento con pH ácido sí parece promover cambios en el virus que afectan parcialmente su infectividad en células sin tratamiento pero que le permiten entrar de una forma independiente de clatrina, pero no del tratamiento con Bafilomicina-A1. Los resultados obtenidos en este experimento sugieren además que los cambios promovidos en el virus por el tratamiento con pH ácido, antes de que el virus se una a su célula huésped, no son suficientes para que el virus evada su paso por endosomas. Existe la posibilidad de que los cambios estructurales que le permiten al virus ingresar a la célula deban ser en el tiempo y sitio exacto, después de haber interactuado con su receptor en

la célula. La interacción de un virus con su receptor puede, en algunos casos (como Hepatitis C) (41), ser uno de los estímulos para que se induzcan cambios estructurales en el virus.

Efecto del pH ácido después del proceso de adsorción del virus

Como se mencionó antes, en algunos virus cuya entrada es dependiente de pH ácido, es necesario que el virus haya interactuado con su receptor para sufrir los cambios conformacionales inducidos por el pH ácido endosomal. En el caso de Yuc8 se desconoce si su interacción con la célula promueve cambios estructurales o sensibiliza las partículas virales a sufrirlos ante un estímulo posterior. Debido a que el pH ácido parece promover cambios en el virus, que parecen ser funcionalmente importantes, existe la posibilidad de que los cambios por el tratamiento con pH ácido sean más evidentes, después de que el virus haya sido adsorbido a las células. Con base en lo anterior, realizamos un experimento en el que el tratamiento con pH ácido se realizó después de haber permitido la unión (pero no la entrada) del virus a 4°C; también utilizando células tratadas con Clorpromacina y Bafilomicina-A1. El tratamiento con pH ácido se realizó, incubando a 37°C para favorecer la entrada (si era el caso), de virus que hubieran sido estructuralmente modificados.

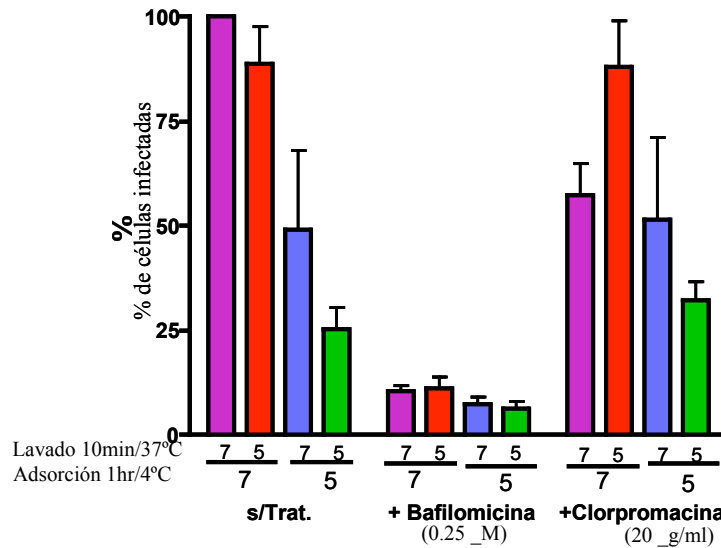


Figura 17. Efecto del tratamiento con pH ácido sobre virus previamente unido a su célula huésped. Se infectaron monocapas de células Caco-2 a diferentes pHs a 4°C para después lavar, por 10 minutos a 37°C, a distinto pH del de la adsorción. Se retiró el medio y se dejó continuar la infección con medio neutro. El título viral obtenido con virus adsorbido y lavado a pH 7 se consideró como el 100 % al cual se refieren todos los datos. La gráfica muestra los resultados de 4 experimentos realizados por duplicado.

Al igual que en el experimento mostrado en la figura 16, el tratamiento del virus a pH ácido después de su unión a la célula no tuvo ningún efecto sobre su infectividad en células tratadas con Bafilomicina-A1. Sin embargo, este tratamiento sí dio diferencias notables en células sin tratamiento y en células tratadas con Clorpromacina.

En la figura 17 se observa que la adsorción de las partículas virales sobre las células promueve o sensibiliza a cambios que hacen al virus más susceptible al tratamiento con pH ácido, ya que la disminución de la infectividad es más pronunciada que cuando el virus fue tratado a pH 5 antes de la adsorción (Fig. 16); sin embargo estos cambios parecen ser reversibles, ya que la infectividad se recuperó parcialmente cuando el lavado se hizo a pH 7 sobre células sin tratamiento. Estos resultados sugieren que los cambios estructurales promovidos por el pH ácido afectan la interacción de astrovirus con su receptor. Además de esto cuando se analizó el efecto del pH sobre células tratadas previamente con Clorpromacina, observamos que el efecto negativo de esta droga sobre la infectividad a pH 7, se bloquea si el virus se trata con pH 5. Es importante notar que cuando el virus fue adsorbido a pH 5, su infectividad fue prácticamente igual tanto en células sin tratamiento como en células tratadas con

Clorpromacina, sugiriendo que el virus está entrando de una forma independiente de clatrina en estas condiciones de pH.

Con base en los resultados mostrados en las figuras 16 y 17, se puede pensar que los cambios estructurales del virus asociados al pH ácido pueden reflejar una función necesaria en los primeros eventos de la infección (Por ej. durante la formación de la vesícula endocítica), ya que este tratamiento atenúa el efecto negativo de la Clorpromacina, sin embargo, el proceso de infección parece aún requerir algún factor, ya que el tratamiento del virus con pH ácido no le permite escapar del efecto de la Bafilomicina-A. Este resultado no coincide con los resultados reportados con otros virus que entran por la misma vía y cuya infectividad se ve bloqueada por Bafilomicina-A1 (como en el caso de virus infeccioso de la anemia equina, rinovirus humano y virus infeccioso de bronquitis) (5, 16) en los que el tratamiento con pH ácido, previo a la infección, promueve, los cambios necesarios para escapar del efecto de la droga. Como se mencionó antes, estos resultados sugieren la participación de otros factores durante la entrada de Yuc8 a su célula huésped (la actividad de las proteasas catepsinas B y L no parece ser alguno de esos factores). Es probable que el tratamiento con pH ácido promueva la entrada del virus a través de una vía independiente de clatrina, pero dependiente de la acidificación de endosomas. Así, el proceso de entrada de astrovirus puede estar formado por una serie de eventos secuenciales donde cada paso provoca cambios en el virus que lo hacen susceptible a las siguientes condiciones.

Con la finalidad de estudiar las primeras interacciones del virus a su célula huésped, en este trabajo se evaluó, además de la dependencia de pH ácido, la posible participación de ubiquitina durante tiempos tempranos de la infección. Para lo cual se diseñó el siguiente experimento.

Efecto de un inhibidor del proteasoma en el proceso de entrada

La internalización de diversos virus a través de endocitosis dependiente de clatrina requiere la participación de diversas moléculas adaptadoras, entre las cuales se encuentra la proteína Eps15 (Tabla 1). En el caso de la entrada de astrovirus, en el laboratorio hemos encontrado que infectividad del virus se bloquea cuando se usan dominantes negativos de Eps15, que como se mencionó antes, además de ser necesaria en el reclutamiento de clatrina contiene motivos de interacción con ubiquitina. Este hecho y el conocimiento de que otros virus (como coronavirus murino y virus de influenza) (17) que entran por endocitosis mediada por clatrina requieren de que el proceso de ubiquitinación se encuentre activo, nos hizo probar la posible participación de este proceso en la entrada de Yuc8. Utilizamos para esto, un inhibidor de la actividad quimi tripsina del proteasoma de ubiquitina, MG132, que provoca una disminución de la ubiquitina libre en la célula y por lo tanto bloquea el proceso de ubiquitinación, y (25). Este péptido inhibidor se probó a diferentes concentraciones sobre células Caco-2 tratadas de la misma manera que con las drogas utilizadas antes. Como se observa en la figura 18, el MG132 fue capaz de bloquear la infección por Yuc8 lo cual sugiere que la actividad del proteasoma de ubiquitina es necesaria durante la infección de Yuc8; sin embargo, debido a que esta droga pudiera tener un efecto generalizado sobre las células, no fue posible concluir que el efecto inhibitorio estuviera limitado a efectos en los primeros pasos de la infección. Para evaluar la etapa de la infección de Yuc8 que estaba siendo bloqueada por MG132, las células se trataron con este péptido a diferentes tiempos desde 1 hora antes de la infección hasta 8 horas después, por lapsos de dos horas (Fig. 19).

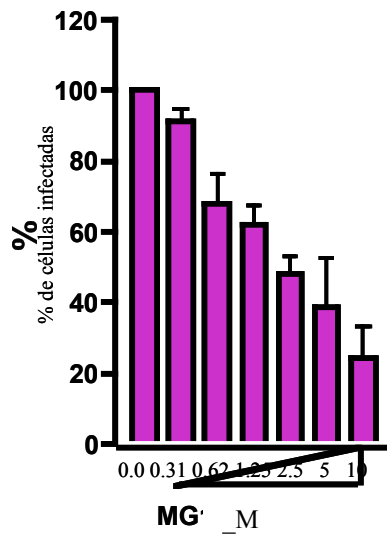
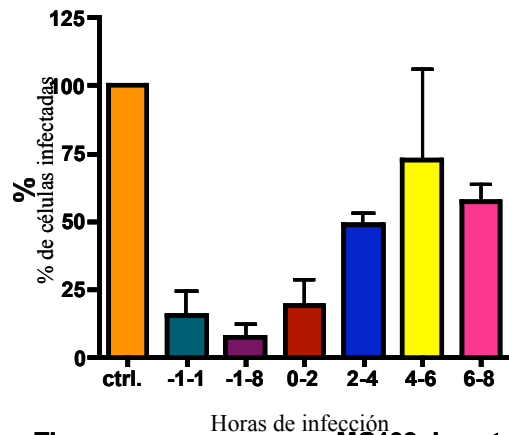


Figura 18. Efecto inhibitorio del MG132 sobre la infectividad de Yuc8. Para conocer el efecto de MG132 se trataron las células 1hr/37°C previa a la infección, durante y 1hr después. Se partió de una concentración 10 μ M y se hicieron diluciones dobles seriadas (de derecha a izquierda). El 100% se consideró como las células infectadas en ausencia de droga y a éste se refieren los demás resultados. En la gráfica se muestran los resultados de 3 experimentos por duplicado.

FFU en presencia de MG 132 a diferentes tiempos



Tiempo en que se agrega MG132 durante la infección.

Figura 19. Efecto inhibitorio del MG132 en diferentes tiempos de la infección de Yuc8. Se infectaron monocapas de células Caco-2 con Yuc8 (m.o.i 0.03ffu/ml) y a diferentes tiempos se agregó MG132 (50 μ M) por lapsos de 2 hrs. El número de células infectadas en ausencia de la droga fue considerado como el 100% al que se refieren los demás datos. Se muestran los resultados de 3 experimentos por duplicado.

Se puede apreciar que el efecto inhibitorio de MG132 fue más pronunciado cuando las células se trataron a tiempos tempranos de la infección, aunque el efecto negativo aun se pudo apreciar ligeramente cuando la droga se agregó a 6 horas después de la infección. Estos datos indican que el tratamiento con MG132 está afectando principalmente el

proceso de entrada de Yuc8 (se sabe que el virus entra en menos de 90 minutos). La ubiquitina es un polipéptido que se ha encontrado involucrado en la endocitosis de diferentes receptores (7, 9, 15, 25, 36, 40) ya que forma parte de algunas moléculas adaptadoras que participan en el ensamble de complejos asociados a endosomas. En el caso de virus se ha reportado que la actividad del proteasoma de ubiquitina se requiere para que los virus (como coronavirus murino y virus de influenza) (17) sean liberados al citosol. En el caso de Yuc8 no podemos concluir, con los experimentos realizados, qué paso de la entrada está siendo inhibido por el MG132, ni si el efecto observado se debe específicamente a los bajos niveles de ubiquitina o si la actividad del proteasoma de ubiquitina por sí misma es necesaria como en el caso de algunos receptores (EGFR, GluRs) (20, 34, 42) donde se inhibió la endocitosis cuando bloquearon específicamente la actividad del proteasoma de ubiquitina y no cuando bloquearon los sitios de ubiquitinación del receptor. Los experimentos realizados en este trabajo y, en el laboratorio, en los que se ha encontrado que la proteína Eps15 es necesaria durante la entrada de astrovirus, sugieren que la ubiquitinación puede ser necesaria durante los primeros eventos de la infección de Yuc8.

CONCLUSIONES

- El tiempo medio de pegado de las partículas infecciosas de Yuc8 a células Caco-2 es de 9.44 minutos.
- El pH ácido parece promover cambios estructurales en Yuc8 que le permiten ingresar a la célula por una forma independiente de endocitosis mediada por clatrina.
- La actividad de enzimas endosomales catepsinas B y L no parece ser necesaria para el ingreso productivo del virus.
- El proceso de ubiquitinación posiblemente se encuentre involucrado en el proceso de entrada de astrovirus.

BIBLIOGRAFIA

1. **Al-Mutairy, B., J. E. Walter, A. Pothen, and D. K. Mitchell.** 2005. Genome Prediction of Putative Genome-Linked Viral Protein (VPg) of Astroviruses. *Virus Genes* **31**:21-30.
2. **Bass, D. M., and S. Qiu.** 2000. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. *J Virol* **74**:1810-4.
3. **Baxt.** 1986. Nature of the interaction between Foot-and-Mouth Disease Virus and Cultured Cells, p. 126-137. *In* R. L. Crowell (ed.), *Virus Attachment and Entry into Cells*, 1^aed. ed, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. **Bowman, E. J., A. Siebers, and K. Altendorf.** 1988. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:7972-6.
5. **Brindley, M. A., and W. Maury.** 2005. Endocytosis and a low-pH step are required for productive entry of equine infectious anemia virus. *J Virol* **79**:14482-8.
6. **Chu, V. C., L. J. McElroy, V. Chu, B. E. Bauman, and G. R. Whittaker.** 2006. The avian coronavirus infectious bronchitis virus undergoes direct low-pH-dependent fusion activation during entry into host cells. *J Virol* **80**:3180-8.
7. **d'Azzo, A., A. Bongiovanni, and T. Nastasi.** 2005. E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation. *Traffic* **6**:429-41.
8. **Dimitrov.** 2004. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nature* **2**:109-122.
9. **Dupre, S., C. Volland, and R. Haguenaer-Tsapis.** 2001. Membrane transport: ubiquitylation in endosomal sorting. *Curr Biol* **11**:R932-4.
10. **Ebert, D. H.** 2002. Cathepsin L and Cathepsin B mediate Reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *The Journal of Biological Chemistry* **277**:24609-17.
11. **Fernandez, M. T.** 2002. Procesamiento proteolítico de la poliproteína codificada por el ORF2 del serotipo 8 de astrovirus humano. Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jal.
12. **Geigenmuller, U., Méndez, E, Matsui, S.** 2003. Studies on the molecular biology of human astrovirus, p. 567-600. *In* U. a. G. Desselberger, J (ed.), *Viral Gastroenteritis*, vol. 1. Elsevier.
13. **Guix, S., S. Caballero, A. Bosch, and R. M. Pinto.** 2004. C-terminal nsP1a protein of human astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA. *J Virol* **78**:13627-36.
14. **Helenius, P. L. a. A.** 2003. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Cell Biology* **15**:414-422.
15. **Ingham, R.** 2004. The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases. functional diversity within a common modular architecture. *Nature* **23**:1972-84.
16. **Jin, S.** 2005. Receptor-Mediated entry by Equine Infectious Anemia Virus utilizes a pH- dependent endocytosis pathway. *J Virol* **79**:14489-97
17. **Khor, R., L. J. McElroy, and G. R. Whittaker.** 2003. The ubiquitin-vacuolar protein sorting system is selectively required during entry of influenza virus into host cells. *Traffic* **4**:857-68.

18. **Krishna, N. K.** 2005. Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology. *Viral Immunol* **18**:17-26.
19. **Liebl, D., F. Difato, L. Hornikova, P. Mannova, J. Stokrova, and J. Forstova.** 2006. Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes. *J Virol* **80**:4610-22.
20. **Longva, K. E., F. D. Blystad, E. Stang, A. M. Larsen, L. E. Johannessen, and I. H. Madshus.** 2002. Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J Cell Biol* **156**:843-54.
21. **Maratos-Flier, E., M. J. Goodman, A. H. Murray, and C. R. Kahn.** 1986. Ammonium inhibits processing and cytotoxicity of reovirus, a nonenveloped virus. *J Clin Invest* **78**:1003-7.
22. **Marsh, M., and A. Helenius.** 2006. Virus entry: open sesame. *Cell* **124**:729-40.
23. **Matsui, M., and H. B. Greenberg.** 1996. Astroviruses, p. 811-823. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 3rd ed, vol. 1. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.
24. **Matsui, S. M., D. Kiang, N. Ginzton, T. Chew, and U. Geigenmuller-Gnirke.** 2001. Molecular biology of astroviruses: selected highlights. *Novartis Found Symp* **238**:219-33; discussion 233-6.
25. **Melikova, M. S., K. A. Kondratov, and E. S. Kornilova.** 2006. Two different stages of epidermal growth factor (EGF) receptor endocytosis are sensitive to free ubiquitin depletion produced by proteasome inhibitor MG132. *Cell Biol Int* **30**:31-43.
26. **Mendez-Toss, M., P. Romero-Guido, M. E. Munguia, E. Mendez, and C. F. Arias.** 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *J Gen Virol* **81**:2891-7.
27. **Méndez, E.** 1999. Entry of Rotaviruses is a multistep process. *Virology* **263**:450-459.
28. **Mendez, E., E. Salas-Ocampo, and C. F. Arias.** 2004. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *J Virol* **78**:8601-8.
29. **Mendez, E., M. P. Salas-Ocampo, M. E. Munguia, and C. F. Arias.** 2003. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. *J Virol* **77**:11378-84.
30. **Mendez, E., M. P. Salas-Ocampo, M. E. Munguia, and C. F. Arias.** 2003. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. *J Virol* **77**:11378-84.
31. **Nicola, A. V., A. M. McEvoy, and S. E. Straus.** 2003. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J Virol* **77**:5324-32.
32. **Nurani, G., B. Lindqvist, and J. M. Casasnovas.** 2003. Receptor priming of major group human rhinoviruses for uncoating and entry at mild low-pH environments. *J Virol* **77**:11985-91.
33. **Pager, C. T., W. W. Craft, Jr., J. Patch, and R. E. Dutch.** 2006. A mature and fusogenic form of the Nipah virus fusion protein requires proteolytic processing by cathepsin L. *Virology* **346**:251-7.
34. **Patrick, G. N., B. Bingol, H. A. Weld, and E. M. Schuman.** 2003. Ubiquitin-

- mediated proteasome activity is required for agonist-induced endocytosis of GluRs. *Curr Biol* **13**:2073-81.
35. **Romero-Guido, P.** 2005. Análisis de la estructura primaria y estudios sobre expresión y procesamiento de la región no estructural del genoma de astrovirus humano (Yuc8). UNAM, México.
 36. **Rotin, D., O. Staub, and R. Haguenauer-Tsapis.** 2000. Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* **176**:1-17.
 37. **Sanchez-San Martin, C., T. Lopez, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol* **78**:2310-8.
 38. **Schornerberg, K., S. Matsuyama, K. Kabsch, S. Delos, A. Bouton, and J. White.** 2006. Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *J Virol* **80**:4174-8.
 39. **Sieczkarski, S. B., and G. R. Whittaker.** 2005. Viral entry. *Curr Top Microbiol Immunol* **285**:1-23.
 40. **Strous, G. J., and R. Govers.** 1999. The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci* **112 (Pt 10)**:1417-23.
 41. **Tscherne, D.** 2005. Time- and Temperature dependent activation of Hepatitis C virus for low- pH triggered entry. *Journal of Virology* **80**:1734-1741.
 42. **van Kerkhof, P., C. M. Alves dos Santos, M. Sachse, J. Klumperman, G. Bu, and G. J. Strous.** 2001. Proteasome inhibitors block a late step in lysosomal transport of selected membrane but not soluble proteins. *Mol Biol Cell* **12**:2556-66.
 43. **Whittaker, S. S. B. a.** 2002. Dissecting virus entry via endocytosis. *Journal of General Virology* **83**:1535-45.
 44. **Yu, G.-Y.** 2004. The ubiquitin-proteasome system facilitates the transfer of Murine Coronavirus from endosomes to cytoplasm during virus entry. *Journal of Virology* **79**:644-648.