



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO Y FISIOLÓGIA
MOLECULAR**

**PAPEL DE GANGLIÓSIDOS EN LA INFECCIÓN DE
CÉLULAS MA104 POR ROTAVIRUS**

T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

Miguel Angel Martínez Mercado

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Pavel Isa



CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO, 2009



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.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de virología de los Dres. Carlos Arias y Susana López del Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría del Dr. Pavel Isa. Durante la realización de este trabajo conté con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 204662. El proyecto fue desarrollado con el donativo de PAPIIT, UNAM número IN210807.

AGRADECIMIENTOS

A Pavel por la confianza, paciencia, enseñanza y amistad que me ha brindado en esta etapa de mi formación académica.

A los Dres. Carlos Arias y Susana López en cuyo laboratorio realice este trabajo, por los consejos, observaciones y comentarios.

A mi familia que siempre me ha apoyado, a mis hermanas Angelica, Cristina, María y especialmente a mis padres Miguel y Cristina.

A mis amigos Gilda, Mónica y Xico por su apoyo, compartir sus experiencias y amistad, mil gracias.

A mis colegas y cuates del defec, Carlos, Omar y Paola por compartirme su amistad, las aventuras y desventuras, las discusiones, por su apoyo en las buenas y en las malas.

Al Dr Ramón Gonzalez por sus comentarios y observaciones a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A mis sinodales, Dra. Yvonne Rosenstein, Dra. Laura Palomares, Dr Juan Miranda por revisar mi tesis, por los comentarios y sugerencias.

Al grupo Arias/López: Rosa, Rocío, Michelle, Daniela, Camilo, Rafa, Pedro, Hilda, Liliana, Ernesto, Gaby, Diana, Tomás, Margarito, Marco Aurelio, Vicenta y los que me faltan. Por los conocimientos compartidos y la particular convivencia del lab.

INDICE

Abreviaturas	V
Resumen	1
Introducción	2
Generalidades de rotavirus	3
Ciclo replicativo de rotavirus	9
Interacción del virus con la célula	12
Gangliósidos	15
Hipótesis	23
Objetivos	23
Materiales y Método	24
Resultados	32
Discusión	48
Conclusiones	55
Perspectivas	56
Referencias	57

ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementario
Cer	ceramida
CTB	subunidad β de la toxina de cólera
DLP	partícula viral de doble capa protéica
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRM	dominio de membrana resistente a detergente
dsRNA	RNA de doble cadena
ELISA	ensayo enzimático inmunosorbente
ER	retículo endoplásmico
FBS	suero fetal bovino
FFU	unidades formadoras de focos
Fuc	fucosa
GA1	asialo gangliósido 1
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetil galactosamina
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GD1a	disialogangliósido 1a
GD1b	disialogangliósido 1b
GD2	disialogangliósido 2
GD3	disialogangliósido 3
Glc	Glucosa
GlcCer	glucoceramida
GlcNAc	N-acetil glucosamina
GM1/GM1a	monosialogangliósido 1
GM2	monosialogangliósido 2
GM3	monosialogangliósido 3
GM3S	enzima β -galactósido α -2,3-sialil transferasa 5
GSLs	glicoesfingolípidos
GTP	Guanosín trifosfato
HA	Hemaglutinina
hpi	horas post infección
HPLC	cromatografía líquida de alta eficiencia
hpt	horas post transfección
int	integrina
Lac	Lactosa
LacCer	Lactoceramida
Luc	Luciferasa
MβCD	metil- β -ciclodextrina
MOI	multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
NA	Neuraminidasa
NeuAc	ácido N-acetil neuramínico
NeuGc	ácido N-glicolil neuramínico
NMR	Resonancia magnética nuclear
NSPs	proteínas virales no estructurales
ORF	marco abierto de lectura
PABP	proteína de unión a poli-A
PCR	reacción en cadena de la polimerasa

PDMP	DL-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoruro
RI	partícula intermediaria de replicación
RNA	ácido ribonucleico
RNAi	interferencia por RNA
RpdR	RNA polimerasa dependiente de RNA
RRV	cepa de simio de rotavirus
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa acoplado a transcriptasa reversa
SA	ácido siálico
SAT	enzima sialil transferasa
siRNA	RNA interferente pequeño
SM	esfingomielina
TA	temperatura ambiente
TFR-41	cepa porcina de rotavirus
TLC	cromatografía en capa fina
TLP	partícula viral de triple capa protéica
UGCG	enzima UDP-glucosa ceramida glucosil transferasa
UK	cepa bovina de rotavirus
VPs	proteína viral estructural
Wa	cepa humana de rotavirus

RESUMEN

Los rotavirus son el principal agente causal de gastroenteritis en niños menores de 5 años. *In vivo*, rotavirus infecta casi exclusivamente los enterocitos maduros en el intestino delgado, mientras que *in vitro* se puede replicar en células de origen tanto renal como intestinal. La infección por rotavirus se lleva a cabo en varios pasos secuenciales. El primer paso en la infección es el reconocimiento de su célula huésped, en algunas cepas de rotavirus esta interacción se realiza con el ácido siálico (SA), sin embargo se desconoce cuál es la macromolécula que lo contiene. Además, otras moléculas de superficie han sido involucradas en la entrada de rotavirus, entre ellas las subunidades de integrinas $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\beta 2$, $\beta 3$, la proteína de choque térmico 70 y algunos gangliósidos. A la fecha se desconoce el papel de los gangliósidos como una molécula de superficie que posee SA y su relación con la infección por rotavirus. En el presente trabajo se analizó la participación de los gangliósidos en la infección por rotavirus de células renales de mono (MA104). Para cumplir el objetivo, se alteró la producción de gangliósidos mediante la interferencia por RNA de dos enzimas involucradas en su síntesis: UDP-glucosa ceramida glucosil transferasa (UGCG) y beta-galactósido alfa-2,3-sialil transferasa 5 (GM3-s). Inicialmente se realizó la validación de la interferencia por RNA, analizando por RT-PCR la disminución de los RNA mensajeros de las enzimas blanco y consecuentemente se analizó la disminución de gangliósidos. El efecto de la disminución de gangliósidos en la superficie celular sobre la capacidad de infección de rotavirus fue evaluado en cuatro cepas de rotavirus: RRV (simio), TFR-41 (porcina), Wa (humana) y UK (bovina), las cuales mostraron diferentes susceptibilidades a la disminución de gangliósidos en la célula. Posteriormente se evaluó mediante inmuno-microscopía si las disminuciones en la infectividad observadas estaban relacionadas con la disminución de gangliósidos. Además se determinó que el proceso afectado es la entrada del virus a la célula. Una vez establecida la participación de los gangliósidos en la infección, mediante ensayos de bloqueo se observó que las cepas utilizadas tienen diferente susceptibilidad a la preincubación con gangliósidos. Estos resultados muestran en conjunto que los gangliósidos tienen un papel importante en la entrada de rotavirus a la célula huésped.

INTRODUCCION

La gastroenteritis es la inflamación del tracto gastrointestinal definida por un cuadro clínico de diarrea y vómito que además puede ser acompañado de otros síntomas como dolor abdominal, contracciones abdominales, náusea, fiebre y presencia de sangre y/o mucosidad en las heces. Se estima que a nivel mundial ocurren aproximadamente 1 400 millones de episodios diarreicos y 2.2 millones de muertes anuales a causa de enfermedades diarreicas [1]. Esta enfermedad puede ser causada por diferentes patógenos, los agentes virales son los más importantes.

De forma particular, cada año a nivel mundial los rotavirus causan aproximadamente 111 millones de episodios de diarrea y 440 000 muertes en infantes por deshidrataciones severas. Esto los coloca como la causa más importante de diarrea en niños menores de 5 años [2]. Se ha estimado que para esta edad cada niño sufrió al menos 1 episodio de gastroenteritis por rotavirus, 1 de cada 5 realiza una consulta médica y 1 de cada 65 es hospitalizado [3]. Los rotavirus infectan también a diversas especies de animales domésticos, las crías de ganado como becerros, potros, cerdos y borregos se ven afectados con infecciones graves, lo que representa un fuerte impacto en pérdidas económicas para el sector ganadero.

Generalidades de rotavirus

El género rotavirus es parte de la familia *Reoviridae*. Estos virus tienen un diámetro aproximado de 100 nm. Son virus de forma icosaédrica, no-envueltos; es decir, no poseen una cubierta lipídica y están compuestos de tres capas concéntricas de proteínas. Su genoma está compuesto de 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) que codifican para 6 proteínas estructurales (VPs) y 6 proteínas no-estructurales (NSPs), entonces cada segmento codifica para al menos 1 proteína. El virión contiene todas las proteínas necesarias para la producción de su RNA mensajero (mRNA) [4].

Estructura de rotavirus

La capa interna o “core” está formada por 120 moléculas de la proteína VP2 que se encuentra dispuesta en 60 dímeros que cubren al genoma y las proteínas VP1 (RNA polimerasa dependiente de RNA) y VP3 (guanililtransferasa) involucradas en la producción y maduración de los mRNAs. La capa intermedia está formada por VP6, la proteína más abundante en la partícula madura. La partícula formada por el core y la capa intermedia se conoce como DLP (del inglés double layered particle) o partícula de doble capa; la DLP aunque es transcripcionalmente activa *in vitro*, no es infecciosa, a menos que sea internalizada artificialmente a la célula, por ejemplo, mediante lipofección [5]. La capa externa está compuesta por 280 trímeros de la proteína VP7 y 60 proyecciones de la proteína VP4. La partícula infecciosa del virus posee las tres capas y es llamada partícula de triple capa (TLP del inglés triple layered particle) (Fig. 1).

Mediante el estudio con microscopía crioelectrónica se determinó que el arreglo de las proteínas virales en dímeros y trímeros, junto con la simetría icosaédrica, hacen que en el virus existan 132 canales que comunican la superficie exterior con el core. Tres tipos de canales pueden ser distinguidos basados en su posición y tamaño. Doce canales tipo I localizados en los ejes de simetría cinco, 60 canales tipo II en los ángulos que rodean los ejes de simetría cinco y 60 canales tipo III que se encuentran en los ejes de simetría tres. Estos canales tienen diferentes funciones, algunos canales están involucrados en la importación de metabolitos requeridos para la transcripción del RNA y otros canales se usan para la exportación de los nuevos mRNAs que participarán en la replicación del virus [4].

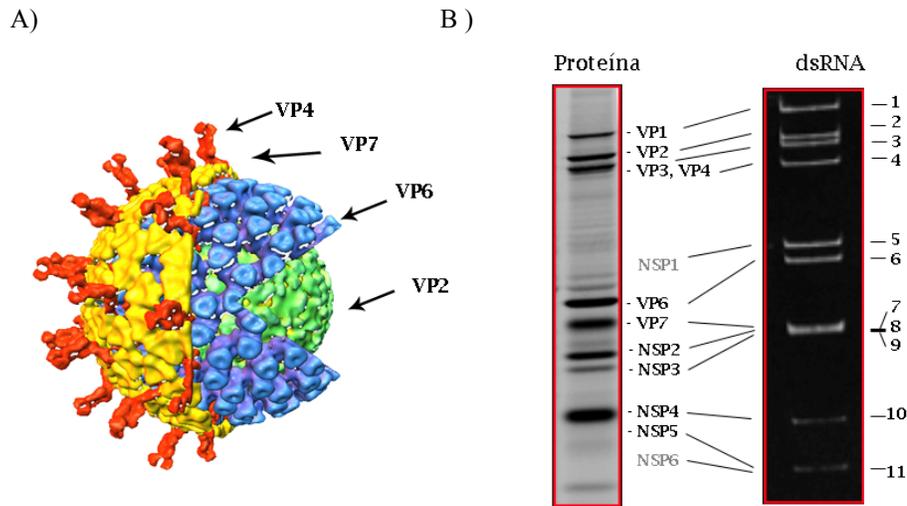


Figura 1. Estructura de rotavirus. Los rotavirus son virus no envueltos compuestos de 3 capas concéntricas de proteína. A) el core o capa interna (verde) está compuesta por VP2 y rodea al genoma, también contiene las proteínas VP1 y VP3; la capa intermedia (azul) está formada por VP6, llamada DLP; es una partícula no infecciosa, pero transcripcionalmente activa *in vitro*; la capa más externa está formada por las proteínas VP7 y VP4 (amarillo y rojo respectivamente). La partícula con 3 capas se llama TLP y es la partícula infecciosa. B) Los 11 fragmentos del genoma codifican para 12 proteínas, NSP1 y NSP6 no son detectadas. La reconstrucción de rotavirus es cortesía de Dr. B.V.V. Prasad, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA.

Clasificación de rotavirus

Con base en las diferencias en la proteína VP6, los rotavirus son clasificados serológicamente en 7 grupos (de A a G). Los grupos A, B y C infectan animales y humanos, mientras que los grupos D, E, F y G sólo han sido encontrados en aves. Se ha demostrado que el grupo A es el causante de diarrea en infantes, mientras que el grupo B ha sido asociado con epidemias anuales de diarrea severa y el grupo C ha sido reportado en muestras fecales de niños con diarrea, pero su significancia clínica no ha sido demostrada. Dentro de cada grupo los rotavirus son clasificados en serotipos basados en la reactividad del virus a anticuerpos neutralizantes contra las proteínas de la capa externa VP4 y VP7. Hasta ahora se han determinado 15 serotipos G basados en la proteína VP7 y 14 serotipos P basados en VP4 [4].

Proteínas estructurales de rotavirus

Seis de los segmentos del genoma codifican proteínas estructurales, es decir las que forman al virión maduro. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 que forman el core, tienen afinidad por RNA de cadena sencilla, pero sólo VP1 muestra reconocimiento secuencia específico del RNA de rotavirus, ya que VP1 es la RpdR viral y tiene funciones tanto de transcriptasa como de replicasa. Para esta última actividad VP1 requiere de su interacción con VP2 [6]. Por su parte, VP2 tiene la capacidad de unirse a RNA de una forma no-específica, su papel básico es contener de forma segura y ordenada los 11 segmentos del genoma viral [7, 8]. La proteína VP3 se une a la porción amino terminal de VP2 que está localizada hacia la parte interna de la capa. Además VP3 une covalentemente guanósín trifosfato (GTP), indicando que es una guanililtransferasa y también se ha mostrado que tiene actividad metiltransferasa. En conjunto, estas dos actividades le dan a VP3 el perfil de una enzima multifuncional de capping [4]. Aún no se ha identificado una actividad helicasa en las proteínas virales estructurales.

La proteína de la capa intermedia VP6 está encargada de proporcionar estabilidad y homogeneidad a la morfología de las partículas virales, ya que interacciona con la capa interna y con la capa externa [9]. La capa externa está formada por las proteínas VP7 y VP4. Se ha demostrado que la estabilidad de la capa externa depende de las concentraciones de Ca^{++} , siendo VP7 la proteína que posee el sitio de unión a este catión divalente [10, 11]. VP7 es una glicoproteína arreglada en trímeros e interactúa por su cara interna con VP6. Por su parte, VP4 se proyecta desde la superficie del virión en forma de espículas y se puede encontrar dispuesta en dímeros o trímeros [12]. VP4 es una proteína que es procesada proteolíticamente por tripsina generando dos polipéptidos, VP5 y VP8; este corte favorece la infectividad del virus [13].

Ya que la capa exterior del virus tiene la función de reconocer a su célula huésped, las proteínas que la conforman poseen diferentes dominios de interacción con moléculas de superficie celular. En VP4, el fragmento VP5 contiene dos motivos de unión a integrinas; el motivo IDA para la integrina $\alpha4\beta1$ y DGE para la integrina $\alpha2\beta1$. VP5 también contiene una región hidrofóbica y un dominio para interacción con la proteína de choque térmico hsc70. Por su parte, el dominio VP8 contiene los sitios de unión a ácido siálico, una región que llevó a identificar a VP4 como la hemaglutinina del virus [14].

La proteína VP7 contiene tres motivos de unión a integrinas; el motivo GPR para la integrina $\alpha\beta 2$, el motivo LDV para la integrina $\alpha 4\beta 1$ y el motivo CNP para la integrina $\alpha\beta 3$ [15]. El extremo N-terminal de VP7 se caracteriza por tener dos regiones hidrofóbicas, también cerca de este extremo se puede encontrar un sitio de N-glicosilación conservado y hasta 2 sitios adicionales dependiendo de la cepa [16-18]. A lo largo de la proteína se presentan tres dominios altamente inmunogénicos, llamados A, B y C. La distribución de estos motivos puede ser observada gráficamente en la Figura 2.

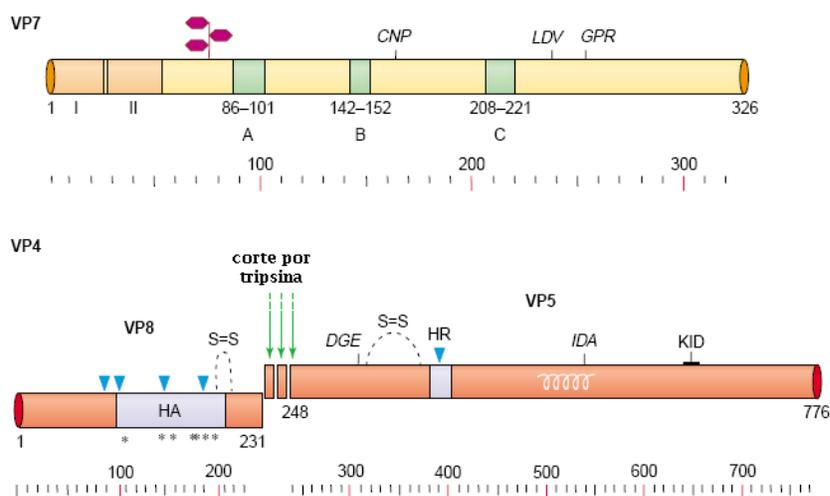


Figura 2. Características estructurales de las proteínas de la capa externa. VP7 es una proteína que une calcio. I y II marcan las regiones hidrofóbicas en el extremo N-terminal de la proteína. Se muestra con hexágonos el sitio de N-glicosilación. CNP, LDV y GPR son motivos de unión a integrinas. En verde se marcan los 3 dominios antigénicos llamados A, B y C. VP4 es la hemaglutinina del virus (HA), la flecha indica el sitio de corte por tripsina en VP8 y VP5. En VP8 se indican con asteriscos los aminoácidos que interactúan con ácido siálico. Con flechas azules se indican los sitios de unión de los anticuerpos monoclonales neutralizantes. En VP5 se muestran los motivos de unión a integrinas IDA y DGE; HR denota la región hidrofóbica y hacia el extremo carboxi-terminal (aminoácidos 642-645) se muestra el sitio del péptido KID, el cual interactúa con hsc70. Modificada de [15].

Proteínas No-Estructurales

Las proteínas no-estructurales son detectadas en las células infectadas pero no en las partículas virales maduras; son producidas dentro de la célula y son las responsables de los procesos de replicación y ensamble viral. Se sabe que todas las proteínas no-estructurales; excepto NSP4 interactúan con ácidos nucleicos.

NSP1 parece no ser esencial para la replicación del virus y, aunque es la proteína viral menos conservada, su importancia reside en la capacidad que tiene para inhibir la respuesta antiviral celular, ya que induce la degradación mediada por proteosoma de los factores de regulación de interferón IRF3, IRF5 e IRF7 al parecer mediante el reconocimiento de un dominio conservado en esta familia de proteínas [19]. NSP2 es una NTPasa oligomérica que está localizada en los viroplasma, posee actividad helicasa y puede estar involucrada en la encapsidación del RNA [20]. NSP3 participa en la traducción de los mensajeros virales desplazando por competencia a la proteína celular PABP [poly(A)-binding protein] con la que comparte dos características funcionales; unirse al extremo 3' de los RNA mensajeros, en este caso virales, y unirse al factor eIF4G, para así formar parte del complejo de inicio de la traducción, impidiendo que los RNA mensajeros celulares se traduzcan [21]. Sin embargo, se ha demostrado mediante el silenciamiento con RNAi que la proteína NSP3 no se requiere necesariamente para la traducción de los RNA mensajeros virales ni es esencial para la replicación del virus en cultivos celulares [22].

NSP4 es una proteína transmembranal localizada en retículo endoplásmico, donde juega un papel muy importante en la morfogénesis del virus, el dominio C-terminal citoplásmico de esta proteína actúa como un receptor intracelular de DLPS; NSP4 se une sólo a las DLPS sintetizadas *de novo* y media la internalización de estas partículas al lumen del retículo endoplásmico, donde se realiza el ensamblaje de la capa externa. Recientemente se observó que el silenciamiento de NSP4 en células infectadas afecta la distribución de otras proteínas virales, la síntesis de RNA mensajero y la formación de viroplasma [23]. Estos efectos en la replicación viral en conjunto con las observaciones de interacciones con proteínas celulares como caveolina-1 [24] o el marcador de fagocitosis LC3 [25] sugieren que existen actividades de NSP4 que aún no son caracterizadas. Además, se ha demostrado que NSP4 funciona como enterotoxina al causar diarrea dependiente de edad en ratones, semejante a la causada por rotavirus [26].

NSP5 es una fosfoproteína O-glicosilada que se autoensambla en dímeros y presenta actividad autocinasa [27]. NSP5 participa en la formación de los viroplasma [25] y la disminución de su expresión por RNAi tiene como consecuencias la disminución en cantidad y tamaño de los viroplasma, disminución de síntesis de RNA viral y menor producción de partículas virales infecciosas [28]. Además, se ha demostrado que interactúa

con NSP2 [29]. NSP6 es codificada por un marco abierto de lectura (ORF, del inglés open reading frame) alternativo dentro del segmento 11, se sabe que interacciona con NSP5 y muestra acumulación en los viroplasmos [30]. Finalmente en la Tabla 1 se muestra un resumen de la relación entre los 11 segmentos de dsRNA que conforman el genoma de rotavirus, las proteínas que codifican y algunas de sus funciones principales.

Tabla 1. Relación de genes de rotavirus y la proteínas que codifican.

Gen	Proteína	Localización en la partícula	Función
1	VP1	NC	RNA polimerasa dependiente de RNA.
2	VP2	NC	Unión a RNA, conformación del core.
3	VP3	NC	Guanilil-transferasa.
4	VP4	CE	Reconocimiento de célula huésped, conformación de la capa externa.
5	NSP1	NS	Unión a RNA.
6	VP6	CI	Conformación de la capa intermedia.
7	NSP3	NS	Unión a eIF4G, unión al extremo 3' de los genes virales.
8	NSP2	NS	Unión a RNA, probable actividad de NTPasa.
9	VP7	CE	Glicoproteína con determinantes antigenicos de serotipo, conformación de la capa externa.
10	NSP4	NS	Enterotoxina, receptor en retículo endoplásmico.
11	NSP5	NS	Formación de viroplasmos, posible cinasa autocatalítica.
	NSP6	NS	Interacción con NSP5.
NS - Proteína no estructural NC - Núcleo o core CI - Capa intermedia CE - Capa externa			

Ciclo replicativo del virus

El estudio de la replicación de rotavirus se ha logrado gracias a la adaptación de su crecimiento en cultivos celulares. MA104 (células epiteliales de riñón de mono) es una de las principales líneas celulares en que se desarrollaron estos estudios. El ciclo replicativo de rotavirus puede ser dividido en varias fases. Brevemente, se comienza con la unión del virus a la célula huésped por medio de receptores, le sigue la entrada del virus y el desensamblaje de la capa externa para dar lugar a partículas transcripcionalmente activas; entonces el virus transcribe su material genético y sintetiza proteínas virales. Continúa la encapsidación de material genético y el ensamblaje de la nueva generación de viriones para finalmente liberar la progenie (Fig. 3).

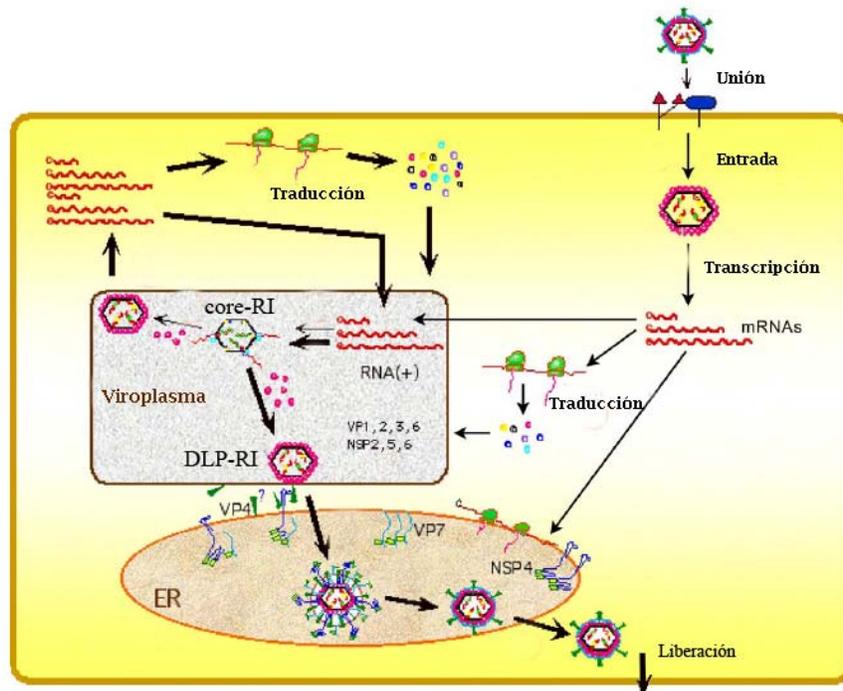


Figura 3. Ciclo replicativo de rotavirus. Se muestran los diferentes procesos realizados por rotavirus durante la infección. Unión a la superficie celular por los receptores virales; entrada y desensamblaje de la capa externa del virus para formar DLPs; transcripción del RNA viral; síntesis de las proteínas virales; ensamblaje de partículas replicativas intermediarias (RI) y síntesis de hebras negativas de RNA; posible segundo ciclo de replicación; ensamblaje de la capa intermedia; migración de partículas hacia el retículo endoplásmico (ER); adquisición de una cubierta lipídica temporal; pérdida de la capa lipídica y generación de la partícula madura. Por último, liberación del virus. Modificado de [31].

Unión, entrada y desensamblaje

Las dos proteínas que conforman la capa externa están involucradas en el reconocimiento de la célula huésped. Se han identificado varias moléculas de superficie que interactúan con la capa externa de rotavirus, al parecer de forma secuencial [15]. Entre las moléculas identificadas se encuentra el ácido siálico, las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha x\beta 2$ y $\alpha v\beta 3$; la proteína hsc70 y algunos glicolípidos. Cabe mencionar que el uso y dependencia de estos receptores varía de acuerdo a la cepa viral [32]. Posterior a la unión, el virus es internalizado por un mecanismo aun no descrito, pero se ha reportado que la internalización no se puede llevar a cabo a 4°C, lo que indica que este paso requiere de procesos celulares activos [33]. En el caso de la cepa de rotavirus RRV, se ha demostrado que la internalización es independiente de clatrina y caveolina, pero depende de dinamina. Posiblemente la ruta de internalización usada es mediante una endocitosis dependiente de balsas lipídicas, que es definida por su independencia de clatrina, dependencia de dinamina y es sensible a la depleción de colesterol [34, 35]. Otras cepas de rotavirus pueden utilizar otras vías de entrada como la dependiente de clatrina, flotilina y pH [36].

Un factor muy importante para el proceso de entrada son los microdominios ricos en esfingolípidos y colesterol, resultado de la asociación diferencial de lípidos en la membrana mejor conocidos como balsas lipídicas. Tal composición de lípidos otorga a estos microdominios una característica especial de fluidez lateral que los hace resistentes a la solubilización por detergentes a baja temperatura y por lo tanto pueden ser aislados por centrifugación como fracciones de membrana resistente a detergentes (DRMs) [37].

En el caso de la unión de rotavirus RRV a la célula, estudios recientes mostraron que el gangliósido GM1, las subunidades de integrinas $\alpha 2$ y $\beta 3$, y la proteína hsc70 se encuentran asociadas a DRMs [38]. Estos datos sugieren que los dominios de membrana resistentes a detergentes pueden jugar un papel importante en la entrada del virus a la célula proporcionando una plataforma para facilitar una interacción eficiente de los receptores con la partícula viral.

Transcripción y replicación.

La partícula viral posee su propia RpdR (VP1), además posee enzimas que realizan el capping de los transcritos nacientes (VP2 y VP3), lo que incluye actividades de transcriptasa, nucleótido fosfohidrolasa, guanililtransferasa y metilasa. Por lo tanto, al tener toda la maquinaria necesaria dentro del virión, la transcripción ocurre dentro del core del virus [4]. La transcripción de los 11 segmentos es asimétrica y todos los transcritos son cadenas positivas hechas a partir de la cadena negativa del dsRNA [39]. Se piensa que cada segmento de RNA es transcrito por un complejo enzimático localizado alrededor de los canales tipo I, lo que sugiere que varios mRNAs son producidos y liberados simultáneamente [40].

Una vez que se desensambla la capa externa, la partícula infectante realiza el primer ciclo de transcripción de RNAs mensajeros virales para producir proteína viral. El sitio exacto de la replicación dentro del citoplasma aún no se conoce, aunque se piensa que ocurre en los viroplasmos, zonas electrodensas perinucleares no membranosas en el citoplasma donde se localizan las proteínas virales. En un segundo ciclo de transcripción, las partículas virales contenidas en el viroplasma generan más RNA mensajero que es utilizado para producir más proteína viral y/o para obtener más genomas virales, por lo que tres horas después de la infección es posible detectar dsRNA viral y cadenas de RNA tanto positivas como negativas sintetizadas *de novo* [41]. Se asume que la replicación de rotavirus es conservativa, es decir ambas cadenas del dsRNA parental se mantienen dentro de la partícula. Después de la síntesis, el dsRNA progenie se mantiene asociado a partículas subvirales para evitar que se encuentre dsRNA libre en la célula ya que podría desencadenar la respuesta celular antiviral mediada por interferón [42].

Encapsidación y ensamblaje del virión

El mecanismo por el cual se lleva a cabo el empacamiento selectivo y correcto de las partículas virales está aun en debate y existen diversos modelos que proponen una explicación [43]. Un modelo propone la formación de partículas replicativas intermediarias (RI) compuestas de mRNA viral, la polimerasa viral y la enzima que realiza el capping que podría servir para la unión de VP2 y así formar la capa interna. Un segundo modelo sugiere que primero se ensamblan los cores vacíos y posteriormente se introducen los mRNAs. Un

tercer modelo está basado en los datos estructurales que indican que el core representa una colección de unidades pentaméricas cada una conteniendo su propio complejo polimerasa y enzima de capping; el modelo señala que este complejo es el encargado de la producción de cada uno de los segmentos del genoma.

Las DLPs producidas son transportadas e introducidas al RE con la ayuda de la proteína viral NSP4 para ensamblar la tercer capa, este proceso es llamado maduración del virus y es dependiente de calcio. Durante su paso por el RE la partícula viral adquiere una capa lipídica temporal que se pierde en algún momento de la liberación el cual aún no está determinado.

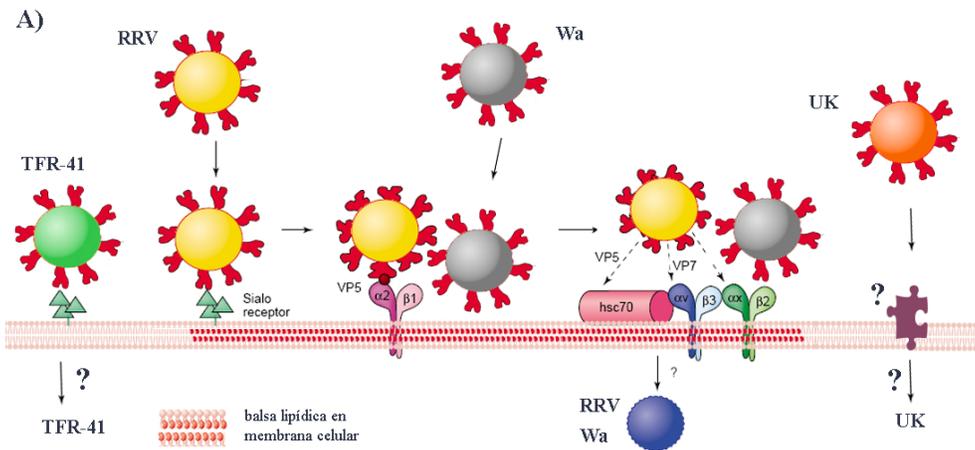
Liberación del virus.

El ciclo infeccioso termina cuando las partículas virales son liberadas de la célula. Este proceso se puede llevar a cabo por vías diferentes dependiendo del tipo celular analizado. Estudios de microscopía electrónica en la línea epitelial no polarizada MA104 han demostrado que la progenie viral es liberada por la lisis de la célula huésped [44]. Estudios en células polarizadas de epitelio intestinal Caco-2 mostraron que inicialmente la liberación de rotavirus ocurre por gemación [45]. Después de la lisis celular, algunas partículas virales DLPs y TLPs se mantienen asociadas con los restos celulares, sugiriendo que estas partículas interactúan con estructuras dentro de la célula [46].

Interacción del virus con la célula.

In vivo, el tropismo de rotavirus tiene una gran especificidad por el enterocito diferenciado en el intestino delgado. Para su estudio *in vitro* rotavirus presenta un rango más amplio infectando diferentes líneas celulares, entre ellas, células de epitelio de riñón, intestino y pulmón [47].

La entrada del virus a la célula es un proceso complejo que se lleva a cabo en varios pasos e involucra la interacción con diferentes moléculas de la superficie celular (Fig. 4). Se sugiere que dichas interacciones producen cambios conformacionales en las proteínas de la capa externa que favorecen y/o permiten exponer dominios de interacción con otros receptores. Se han caracterizado diferentes moléculas de superficie que interactúan con rotavirus, entre las que se encuentran:



B)

	RRV	TFR-41	Wa	UK
NA	+	+	-	-
int	+	-	+	-

Figura 4. Modelo de interacción rotavirus-célula. A) Hasta el momento se tienen identificadas tres moléculas de membrana que interactúan con rotavirus, un sialo-receptor, diversas integrinas y la proteína hsc70. Se ha reportado que éstas tres moléculas, así como rotavirus, se encuentran asociadas a dominios ricos en colesterol y esfingolípidos conocidos como balsas lipídicas. Modificado de [15]. B) Como se observa en la caricatura, diferentes cepas de rotavirus poseen diferentes características en la dependencia de integrinas (int) y la sensibilidad al tratamiento del cultivo celular con neuraminidasa (NA), estas dos características se resumen en la tabla inferior.

Acido siálico. Ha sido reportado que el ácido siálico (ac. N-acetilneuramínico) es usado por diversos virus como receptores de unión, pero requieren de otros receptores para su internalización a la célula [48, 49]. Se ha caracterizado que varias cepas de rotavirus utilizan SA para unirse a la célula [50]. Estas cepas son definidas como sensibles a neuraminidasa (NA sensibles o NA^+), puesto que el tratamiento de cultivos celulares con neuraminidasa reduce drásticamente la infectividad del virus. Existen también cepas virales cuya infección no se ve afectada al tratar las células con neuraminidasa, por lo que son llamadas NA resistentes (NA^-). Se ha demostrado que la interacción de rotavirus con ácido siálico es a través del dominio VP8 de la proteína VP4 [14]. Específicamente los aminoácidos involucrados en la unión a ácido siálico fueron identificados como Tyr155, Tyr188, y Ser190 mediante ensayos de mutagénesis [51] y R101, Y155 y S190 mediante el análisis de la estructura del cristal de VP8 unido a ácido siálico [52]. Los datos estructurales obtenidos por cristalografía de los epítopes de unión a SA de una cepa NA^+ (RRV) y una

cepa NA⁻ (DS-1) mostraron que el epítoto de la cepa NA⁻ es suficientemente diferente para no interactuar con SA, pero no se descarta la posibilidad de que sea un sitio de interacción con un carbohidrato alternativo [53].

Integrinas. Son heterodímeros compuestos por las subunidades α y β , estas moléculas están presentes en la membrana participando en la adhesión celular y en procesos de señalización. Diversas integrinas han sido implicadas en la entrada de rotavirus a la célula huésped [50, 54-58]. Tanto cepas NA-sensibles como NA-resistentes han demostrado reducir su infectividad cuando las células son tratadas con anticuerpos o ligandos específicos de estas integrinas, llamándose por consecuencia dependientes de integrinas o int⁺. Recientemente, se han descrito cepas de rotavirus cuya infectividad no es afectada por la preincubación de células con anticuerpos anti-integrinas, sugiriendo que estas cepas son independientes de integrinas (int⁻) [54].

hsc70. Después de interactuar con los receptores de unión (ácido siálico e integrinas), rotavirus interactúa con la proteína hsc70 mediante un dominio localizado en VP5. El uso de un péptido que mimetiza la región de VP5 (péptido KID) y anticuerpos contra hsc70 han mostrado disminuir la infectividad del virus pero no su unión a la célula indicando que la interacción de rotavirus con hsc70 se efectúa después de la unión [59, 60]. Hasta la fecha, todas las cepas de rotavirus probadas han mostrado dependencia de hsc70 [61].

Glicolípidos. La correlación entre la sensibilidad a neuraminidasa de algunas cepas de rotavirus y los dominios de interacción con ácido siálico presentes en la proteína VP8 llevó a la búsqueda de una molécula celular que pudiera participar en estos procesos. De este modo, los glicolípidos y en especial los gangliósidos han sido importantes blancos de estudio. Los gangliósidos son glicolípidos de membrana derivados de ceramidas con la adición de diferentes unidades glucídicas y residuos de SA (Fig. 5). Ya que los gangliósidos son parte fundamental de este trabajo la siguiente sección se dedica a explicar ampliamente de su estructura hasta la evidencia de su participación como receptores virales.

Gangliósidos

Aproximadamente el 10% de la membrana celular esta compuesta de esfingolípidos complejos. Este grupo de lípidos esta formado por los glicoesfingolípidos (GSLs) y la esfingomielinina (SM), ambos tienen como base hidrofóbica una ceramida (N-acilesfingosina) y difieren por su grupo polar, mientras los GSLs contienen una cadena de carbohidratos, la SM contiene un grupo de fosfocolina. Los carbohidratos encontrados en los glicoesfingolípidos pueden ser glucosa (Glc), galactosa (Gal), fucosa (Fuc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), ácido N-acetilneuramínico (NeuAc) y su variación ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc). Con base en la estructura de carbohidratos que poseen, los GSLs pueden ser divididos en varios tipos o series: lactoseries, globoseries, ganglioseries, galaseries, isogloboseries y mucoseries. Aquellos GSLs que poseen uno o más ácidos neuramínicos o sus derivados son llamados gangliósidos. Además de contribuir a la rigidez estructural de las membranas, participan también en muchas funciones celulares mediadas a nivel de la superficie celular como la diferenciación, proliferación celular, adhesión y transducción de señales [62].

Estructura de gangliósidos

Los gangliósidos están compuestos por una ceramida que está constituida por una larga cadena de amino-alcohol (base de esfingolípido) unido por un enlace carboamido a un ácido graso, generalmente entre C:16 y C:18. Unida a la ceramida se tiene una cadena de carbohidratos de diferente longitud. El primer carbohidrato unido a la ceramida es una glucosa (Glc). Otros carbohidratos que pueden ser añadidos son: Gal, GlcNAc, GalNAc y NeuAc, el ácido siálico más común (Fig. 5).

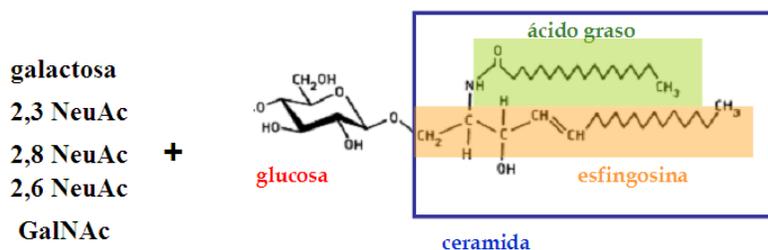


Figura 5. Estructura de los gangliósidos. Una ceramida compuesta de una esfingosina con una cadena de ácido graso es usada como base para la adición de diferentes grupos glucídicos, la glucosa es el primero de ellos, posteriormente pueden ser añadidos galactosa, ácido neuramínico y N-acetilgalactosamina.

Los gangliósidos se encuentran embebidos en la hoja externa de la membrana celular por su porción lipídica y expuesta al entorno extracelular queda la cadena de carbohidratos, la cual funciona como sitio de reconocimiento para otras moléculas. Los gangliósidos pueden fluir en la membrana, separarse y segregarse en balsas lipídicas. Como se mencionó anteriormente, las balsas lipídicas tienen la capacidad de servir como plataformas capaces de coordinar comunicación molecular entre la célula y su exterior [62]. La cadena de carbohidratos es la encargada de interactuar con ligandos, agentes y otras moléculas que controlan funciones celulares como la proliferación, diferenciación, apoptosis y envejecimiento celular [63, 64], siendo entonces el gangliósido una molécula muy dinámica en la membrana.

Biosíntesis de gangliósidos

La biosíntesis de gangliósidos se lleva a cabo en las membranas del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, por enzimas unidas a membranas. La biosíntesis *de novo* comienza con la translocación de ceramidas desde el retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi mediante un mecanismo desconocido, quedando orientada hacia el citoplasma [65]. La ceramida destinada a síntesis de gangliósidos es glucosilada por la UDP-glucosa ceramida glucosil transferasa (UGCG). La glucoceramida cambia de orientación del citoplasma hacia el lado luminal del aparato de Golgi por una flipasa aún no caracterizada. Aquí comienza la producción de la cadena de carbohidratos mediante glicosil transferasas.

La segunda glicosilación la lleva a cabo la lactosa-ceramida sintasa, es la adición de una galactosa a la gluco-ceramida, formando Lacto-ceramida (Lac-cer). La lacto-ceramida es a su vez sialidada para dar origen al gangliósido GM3 y posteriormente por la adición de SA, GM3 producirá GD3, por la acción de dos sialil transferasas (SAT I y SAT II). Cada sialil transferasa reconoce específicamente a su sustrato [66]. Lac-cer, GM3 y GD3 son los puntos de partida para generar tres diferentes series de gangliósidos (Fig. 6).

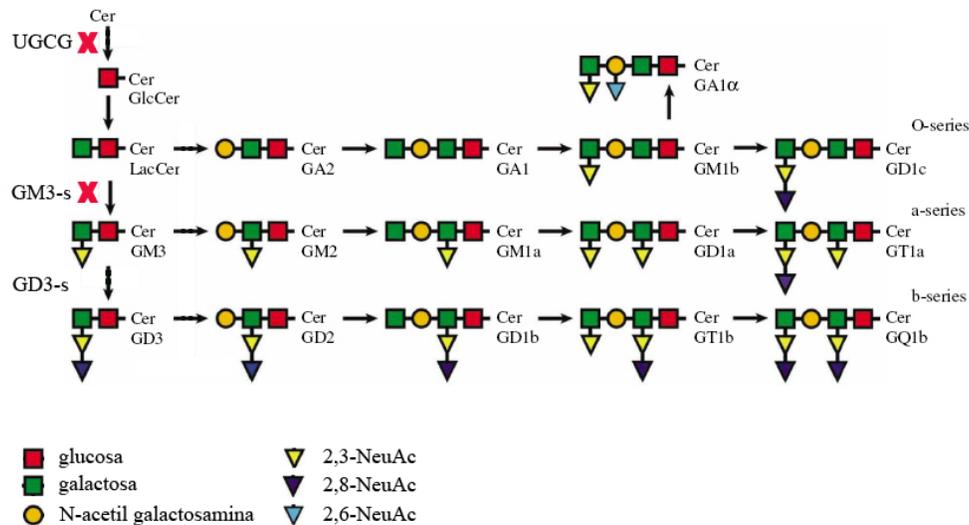


Figura 6. Ruta biosintética de gangliósidos. Se muestra un esquema de la ruta de síntesis de los gangliósidos más comunes. Una ceramida es usada como base para la adición de diferentes grupos glucídicos. A partir de LacCer se produce la serie de gangliósidos ‘O’; a partir de GM3 se produce la serie de gangliósidos ‘a’ y a partir de GD3 se produce la serie de gangliósidos ‘b’. Se muestran los nombres y ubicación de las reacciones que realizan tres enzimas involucradas en la síntesis de gangliósidos analizadas en este trabajo. Con una cruz se marcan las dos enzimas que fueron elegidas como blanco de RNA interferente. Modificado de [63].

A lo largo de cada serie se introduce N-acetil galactosamina, galactosa y ácido siálico dando origen a gangliósidos más complejos. Estas adiciones son llevadas a cabo por N-acetil galactosamina transferasa, galactosil transferasa y sialil transferasa IV (SAT IV). Otras sialosilaciones pueden ser efectuadas por sialosil transferasa V (SAT V). Existe evidencia de que hay un gradiente en la distribución de las glicosil-transferasas en el aparato de Golgi y mas aún hay casos de glicosil transferasas que conforman complejos donde el producto de la primer enzima es procesado inmediatamente por la enzima contigua hasta llegar al producto final [67]. Además, se ha encontrado que algunas de las enzimas juegan papeles clave en la determinación del tipo de gangliósidos a ser sintetizados en una célula o tejido [68-70].

Se asume que el producto final de la biosíntesis es transportado desde el complejo trans-Golgi en forma de vesículas hacia la membrana celular con la que se fusionará; de esta forma la cadena de carbohidratos que estaba orientada hacia el lumen del aparato de Golgi, queda ahora orientada en la membrana hacia el exterior de la célula.

La permanencia de los gangliósidos en la membrana dependerá de varios factores: el

estado metabólico de la célula, la etapa del ciclo celular en que se encuentre y los estímulos externos que recibe la célula, lo que hace difícil determinar su vida media. La aproximación convencional usada para estudiar el recambio basada en la determinación de la presencia de un metabolito marcado radioactivamente no puede ser aplicada, ya que el metabolismo de gangliósidos incluye vías de reciclaje donde el gangliósido endocitado puede tener varios destinos; la degradación total en monómeros, la modificación hacia otro gangliósido (por la adición o eliminación de unidades glucídicas) o la reutilización. Además, los carbohidratos componentes de los gangliósidos pueden ser desviados a otros procesos metabólicos importantes como la glucólisis. En un intento por establecer la vida media de los gangliósidos, Tettamanti y colaboradores describen vidas medias extremas, desde 2 horas hasta 3 días, dependiendo de las células usadas [65]. Un caso excepcional lo muestra el gangliósido GM1 en tejido cerebral de ratón, con 102 días de vida media [71].

La regulación de las transferasas es un factor determinante en la síntesis de gangliósidos. Esta regulación puede ser llevada a cabo tanto transcripcional como post-transcripcionalmente [70, 72-76]. A nivel transcripcional, se ha observado que los genes de transferasas tienen características de genes de “housekeeping”, por lo que podrían ser encontradas en todos los tipos celulares: Los promotores carecen de cajas TATA o cajas CCAAT, pero contienen secuencias ricas en GC en las regiones próximas al promotor como secuencias de unión a los factores Sp1 y AP2 [73, 75]. Sin embargo, aunque los genes de housekeeping son de expresión constitutiva, los genes de transferasas muestran regulaciones finas en su transcripción, por ejemplo se ha observado que para una enzima pueden transcribirse de forma tejido específico diferentes isoformas de la región 5' no traducida en el mRNA producidas por combinaciones de splicing alternativo y el uso alternativo de promotores [76].

Las transferasas también pueden ser modificadas por fosforilación y/o N-glicosilación dando lugar a la regulación post-transcripcional [74]. Además, la disponibilidad de sustrato y la especificidad de las enzimas en catalizar las diferentes reacciones contribuye a determinar los tipos de gangliósidos sintetizados. Hay evidencia que sugiere que los niveles de algunas transferasas son factores críticos para la producción de gangliósidos específicos en un tipo celular, afectando además la presencia de otras enzimas de la vía de síntesis de gangliósidos y sus mRNAs [70]. De esta forma podemos apreciar que la síntesis de

gangliósidos es controlada por mecanismos finos de regulación que permiten a la célula sintetizar los gangliósidos adecuados a su tipo y etapa de desarrollo, dando lugar a una variedad y complejidad enorme.

Perfil de gangliósidos de células MA104

Existe una gran variedad de glicolípidos aislados de diferentes tejidos que hasta el momento supera las 300 especies. Se ha determinado que composición de glicolípidos por una célula es tejido específico y depende del ciclo celular [77-83].

En el caso de la línea MA104, existe un reporte en el que se determinó la composición de gangliósidos mediante su separación en placas de TLC. Como se observa en la Figura 7, las células MA104 contienen principalmente los gangliósidos GM1 y GM3, representando el 31 y 27% de la fracción de glicoesfingolípidos ácidos, respectivamente. Se pueden observar, aunque en menor proporción, otras especies de gangliósidos como GA2, GM2 así como otras especies no identificadas que migran por debajo de GM1, indicando que poseen mayor glicosilación. Es importante mencionar que los autores no pudieron detectar GA1 por cromatografía ni por inmunodetección [84].

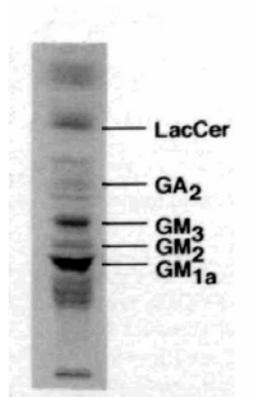


Figura 7. Perfil de gangliósidos de MA104. Se muestra la cromatografía en capa fina de la extracción de gangliósidos de células MA104. Siguiendo el patrón de migración (abajo hacia arriba) se observa que las células MA104 contienen gangliósidos con más de un residuo de SA, que no pueden ser distinguidos individualmente; poseen también diferentes monosialogangliósidos como GM3, GM2 y GM1a y por último glicoesfingolípidos que no poseen SA como GA2 y LacCer. Imagen tomada de [84].

Consecuencias de la depleción de glicosfingolípidos.

Por su participación en diversos aspectos de la vida celular como la diferenciación, adhesión y crecimiento, los gangliósidos son un constituyente importante de la membrana celular, por lo tanto la ausencia o sobrepoblación de estas moléculas posiblemente tendría como consecuencia alguna irregularidad en la célula. Con el objetivo de evaluar este punto se han realizado algunos estudios. El trabajo realizado por Ichikawa y colaboradores [85] consistió en generar a partir de la línea celular MEB-4 (melanoma B-16 de ratón), una línea que careciera de gangliósidos. La selección de la mutante se realizó con base en la carencia de gangliósido GM3 y fue designada como GM-95. Se observó que la mutante GM-95 carecía de actividad ceramida glucosiltransferasa, reacción que durante la síntesis de gangliósidos añade glucosa a la base de ceramida, y se asumió como la causa de la deficiencia de gangliósidos. La línea carente de gangliósidos fue viable y mostró sólo algunos cambios en la morfología y tasa de crecimiento, aunque se necesitaban más estudios que evaluaran otros aspectos. Es así como el grupo dirigido por Hibarayashi continúa con la evaluación y comparación de ambas líneas (parental y mutante). Analizó la adhesión celular y observó que los dos tipos de esfingolípidos complejos presentes en la célula (esfingomielina y glicosfingolípidos) son importantes para la adhesión celular, pero la ausencia de un tipo es compensada por el otro [86].

Por su parte, en el trabajo de Ostermeyer y colaboradores [87], se evaluó la composición e integridad de rafts entre la línea parental MEB-4 y la mutante GM-95. Los resultados mostraron que la deficiencia de glicosfingolípidos (reconocidos por ser una molécula enriquecida en balsas de lípidos) no tiene efectos en primer lugar en la presencia de rafts en ambas líneas; en segundo lugar se observó que los rafts poseen una cantidad similar de esfingolípidos, con la diferencia de que las células GM-95 tienen más esfingomielina posiblemente para complementar la falta de glicosfingolípidos. En tercer lugar se observó que ambas líneas celulares poseen el mismo perfil de proteínas en los rafts. Como cuarto punto, los rafts de ambas líneas celulares mostraron la misma fluidez y por último, los rafts y las proteínas contenidas en éstos presentaron el mismo efecto cuando se trataron a las células con la droga metil- β -ciclodextrina, que secuestra colesterol y como consecuencia desintegra las balsas.

Respecto a otras líneas celulares, se ha reportado que en células Jurkat (línea leucémica de células T humanas), el uso de drogas como PDMP (D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol) que inhibe la síntesis de gluco-ceramida precursor de GSL, no afecta la viabilidad celular [88]. El tratamiento de las células con PDMP tuvo efectos diferenciales sobre proteínas de señalización localizadas en balsas lipídicas, mientras la proteína TCR (receptor para el antígeno de células T) no se veía alterada por la ausencia de GSLs, la señalización por proteínas acopladas a GPI era afectada de forma negativa [88].

Suplementación de glicosfingolípidos a cultivos celulares.

La depleción de GSLs es una buena herramienta para estudiar su participación y/o efecto en los procesos celulares, con los mismos fines se utiliza el proceso opuesto: la suplementación. Esta estrategia no implica que se deba eliminar en primera instancia los GSL presentes para posteriormente añadir el GSL de interés. Existen especies de GSL que no son producidas continuamente durante la vida de una célula, sino que la producción se limita a ciertas etapas [89] y por otra parte, existen líneas celulares modificadas para no producir GSLs [85].

Una gran variedad de tipos celulares incorporan gangliósidos. Entre los que se han experimentado están: astrocitos [90], glioma [91], neuroblastoma [92], fibroblastos [93], eritrocitos y leucocitos [94], linfocitos leucémicos y no-leucémicos [95]. La incorporación del GSL dependerá de muchos factores, sin embargo, los más importantes son el tiempo de incubación y la concentración [96]. Así, los GSLs suplementados pueden encontrarse ligados a la membrana de 3 formas diferentes: como micelas ligadas a la membrana, unidos a alguna proteína, o incorporados a la membrana [97]. Se ha verificado que los GSLs incorporados a membrana lo hacen sin modificaciones en su naturaleza química y son funcionalmente activos [97]. Es importante mencionar que no existe un protocolo específico para establecer un experimento de este tipo, debido al número de variables que participan, se requiere de la estandarización propia del ensayo a montar [96].

Gangliósidos como receptores virales

La preincubación de rotavirus con los gangliósidos NeuAcGM3 y NeuGcGM3 bloqueó la infectividad de rotavirus OSU, una cepa de origen porcino [98]. La infección por las cepas de rotavirus humanos KUN y MO fué inhibida por el tratamiento con gangliósido GM1, pero no por GA1 (análogo de GM1 pero sin SA) [84]. Por otro lado, el uso de inhibidores metabólicos de la glicosilación demostró que la inhibición de la N-glicosilación de proteínas disminuye la infectividad, mientras que la inhibición de la O-glicosilación no mostró efectos inhibitorios [34]. Se ha demostrado, que cepas tanto NA-resistentes (UK) como NA-sensibles (NCVD y SA11) se unen a gangliósidos sobre placas de TLC teniendo preferencia por los gangliósidos con residuos internos y externos, respectivamente [99]. Siguiendo estas aproximaciones se han identificado a diversos glicoconjugados como bloqueadores de la infección de rotavirus [5, 100].

Estudios de la caracterización de receptores para otros virus han demostrado una importante participación de gangliósidos. Por ejemplo se demostró que los gangliósidos específicos GM1 y GD1a son receptores de SV40 y el gangliósido GD1b es receptor de poliomavirus [101]. El estudio de BK virus (causante de graves padecimientos en médula ósea de pacientes inmunosuprimidos y en pacientes de trasplante renal), otro miembro de la familia de poliomavirus, mostró que además de usar glicoesfingolípidos como receptores, utiliza específicamente los gangliósidos GD1b y GT1b [102]. El virus Bovino Adeno-Asociado (BAAV) es incapaz de infectar células COS tratadas con neuraminidasa, pero al restituir las células con gangliósidos exógenos se recupera la infectividad parcialmente, no así cuando se restituyen glicoproteínas [103]. Como último ejemplo se sugiere que el norovirus murino (MNV-1) tiene preferencia en utilizar los SA terminales de los gangliósidos como receptores de unión en la infección de macrófagos murinos. Al tratar cultivos primarios de macrófagos con PDMP (inhibidor de la enzima UGCG), se redujo la unión e infectividad de MNV-1. Este efecto fue rescatado cuando se restituyó específicamente el gangliósido GD1a que posee un residuo de SA externo y uno interno [104].

HIPÓTESIS

Si los gangliósidos son moléculas importantes para la infección por rotavirus, entonces la disminución de gangliósidos en la membrana celular afectará la eficiencia de infección de rotavirus.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar el papel de los gangliósidos en la infección de células MA104 por rotavirus.

Objetivos Particulares

- Inhibir la síntesis de gangliósidos en células MA104.
- Evaluar el efecto que provoca la disminución de gangliósidos en la infección de células MA104 con rotavirus.
- Evaluar la interacción de gangliósidos específicos con rotavirus.

MATERIALES Y MÉTODO

Cultivo celular y virus

La línea celular de epitelio de riñón de mono rhesus MA104 se cultivó en medio Advance DMEM suplementado con 3% FBS (suero fetal bovino) y glutamina. Las cepas virales; rhesus rotavirus (RRV)(Greenberg H, Universidad de Stanford, California), la cepa TFR-41 de origen porcino (Holmes IH, Universidad de Melbourne, Australia), cepa UK de origen bovino (Snodgrass D.R, Moredun Research Institute, Reino Unido) y cepa WA de origen humano (Greenberg H, Universidad de Stanford, California), fueron seleccionadas con base en sus diferencias en el requerimiento de receptores para la infección.

Anticuerpos y reactivos

El anticuerpo policlonal conejo α -rotavirus (α -TLPs), el anticuerpo policlonal de cabra- α -rotavirus, el dirigido contra la proteína viral NSP2 y el anticuerpo α -vimentina fueron producidos en el laboratorio. La Proteína A acoplada a peroxidasa fue obtenida de Amersham-Biosciences. La subunidad β de toxina de colera (CTB) acoplada a peroxidasa, CTB acoplada a biotina, CTB-Alexa-488, Streptavidina acoplada a peroxidasa y el suero α -conejo acoplado a fosfatasa alcalina fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO). El anticuerpo α -conejo acoplado al fluoróforo Alexa-586 fue obtenido de Molecular Probes (Eugene, OR). El anticuerpo monoclonal α -hsc70 fue obtenido de ABR (USA). El anticuerpo policlonal cabra- α -conejo conjugado con peroxidasa fue obtenido de SantaCruz Biotechnologies (Santa-Cruz, CA). Los anticuerpos α -integrina $\alpha 2$ y α -integrina $\beta 3$ fueron obtenidos de Chemicon (Billerica, MA). La mezcla de gangliósidos de cerebro bovino fue obtenida de Calbiochem (San Diego, CA). Los lactocerebrosidos, glucocerebrosidos, GA1, gangliósidos GM1, GM2, GM3, GD3, GD1a y GD1b, fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO).

Producción y purificación de virus

Cultivos confluentes de células MA104 fueron infectados con rotavirus por 1 hora a 37° C. El inóculo se retiró y los cultivos se incubaron por 18 horas a 37° C. Después de la infección, la monocapa fue cosechada por scrapping de las células y todo el medio se

recuperó, se estabilizó con Ca^{2+} 5mM y se congeló dos veces. El virus se activó con tripsina 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por 30 min a 37° C, y fue alicuotado y almacenado a -70° C para su posterior uso. Si el virus se requería puro (solo TLPs o DLPs), el lisado celular fue centrifugado por 60 min a 30,000 rpm a 4° C en un rotor 45TI (Beckman). La pastilla fue resuspendida en buffer TNC (10mM Tris-HCl [pH 7.5], 140 mM NaCl, 10 mM CaCl_2), extraída con Freon y se centrifugó en un gradiente de equilibrio de cloruro de cesio. Se recuperaron por punción dos bandas las cuales contenían TLPs y DLPs. Las partículas de triple o doble capa fueron desaladas mediante columnas de Sephadex G-25 y resuspendidas en TNC. La cantidad de proteína presente se cuantificó mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad) o mediante la lectura a 280nm en el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA).

Titulación de virus y ensayos de infectividad.

Células MA104 cultivadas en placas de 96 pozos fueron inoculadas con diluciones graduales de virus por 1h a 37° C, posteriormente el inóculo se retiró y se realizaron dos lavados con Medio Mínimo Esencial (MEM) sin suero. Después de 14 horas de incubación a 37° C, los cultivos se fijaron con acetona 80% en PBS (NaCl 136 mM, KCl 2.6 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1.76 mM en H_2O mQ). La detección de unidades formadoras de focos (FFU) se realizó mediante un ensayo de inmunoperoxidasa. Brevemente, las monocapas fueron incubadas con anticuerpo policlonal anti-rotavirus (1:3000). El anticuerpo primario fue lavado con PBS. La detección del anticuerpo primario se realizó con Proteína A acoplada a peroxidasa (1:3000) o anticuerpo policlonal cabra-anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:3000). Como sustrato para la peroxidasa se utilizó 3-amino-9-etil-carbazole (Sigma). La determinación del título viral se llevó a cabo mediante el conteo de las FFU en cada dilución.

Interferencia por RNA de enzimas involucradas en síntesis de gangliósidos

Los siRNAs fueron obtenidos de Dharmacon Research (Lafayette, Colorado). Las secuencias fueron escogidas con base en las reglas propuestas por Elbashir et al. (2002) y se muestran en la Tabla 2. Como control irrelevante, se usó un siRNA dirigido contra Luciferasa (siIrr) este siRNA no afectó la síntesis de proteína viral. Se escogieron las enzimas de la vía de síntesis de gangliósidos UGCG que realiza la adición de glucosa a

ceramida y GM3-s que realiza la adición de SA a lactoceramida para formar GM3. La inhibición de estas enzimas se hizo con el fin de bloquear la síntesis de gangliósidos en de forma total (con siUGCG) y de forma parcial (con siGM3-s). Como control endógeno se utilizó siRNA dirigido a la proteína de retículo endoplásmico grp94. Células sembradas 1 día antes en MEM + 5% de suero fetal bovino (SFB) dializado para obtener una densidad del 60-70% el día del ensayo, fueron lipofectadas usando 3µl de oligofectamina (Invitrogen) en 100µl de siRNAs a 600 pmol/ml en MEM. Se añadieron 50µl de la mezcla de lipofección a cada pozo (caja 48 pozos) y se incubó por 18 hrs a 37° C. Después de esta incubación, se retiró la mezcla de lipofección y se sustituyó por MEM + 5% SFB dializado, la incubación continuó por 48 horas a 37° C hasta obtener monocapas confluentes.

Tabla 2. Secuencia de los mRNA blanco y secuencia de los siRNAs usados.		
Luc	mRNA	5' AAGUGCGUUGCUAGUACCAAC 3'
	Sentido	5' GUGCGUUGCUAGUACCAACdTdT 3'
	Antisentido	3' dTdTACGCAACGAUCAUGGUUG 5'
GM3-s	mRNA	5' AAGAGAGCUCAGAAAUAUGCU 3'
	Sentido	5' GAGAGCUCAGAAAUAUGCUdTdT 3'
	Antisentido	3' dTdTTCUCUCGAGUCUUUAUACGA 5'
UGCG	mRNA	5' AAUCAACAACCUUGGAAACAUU 3'
	Sentido	5' UCAACAACCUUGGAAACAUUdTdT 3'
	Antisentido	3' dTdTAGUUGUUGGACCUUUGUAA 5'
grp94	mRNA	5' AAGCCGAAGUUAACAGAAUGA 3'
	Sentido	5' GCCGAAGUUAAGAGAAUGATdT 3'
	Antisentido	3' dTdTTCGGCUUCAAUUCUCUACU 5'
GM3-s = a-2,3-sialiltransferasa 5		
UGCG = UDP-glucosa ceramida glucosil transferasa		
grp94 = proteína de 94 kD regulada por glucosa		
Luc = luciferasa, (siIrr);		

RT-PCR en tiempo real del RNA mensajero de las enzimas interferidas

El nivel del RNA mensajero de las proteínas GAPDH, UGCG, GM3-s, GD3-s y grp94 fue determinado por RT-PCR en tiempo real. Cultivos tratados con RNAs interferentes como se

describe anteriormente, fueron lisados con Trizol y el RNA total fue purificado de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para asegurar la pureza de la muestra se realizó un tratamiento con DNasa (ROCHE, Mannheim, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sintetizó cDNA y posteriormente el DNA fue amplificado en presencia de SybrGreen PCR master mix (Applied Biosystems) mediante los primers correspondientes (Tabla 3), usando el sistema de detección ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). Los resultados fueron normalizados a los niveles del mRNA de GAPDH detectados en cada muestra de RNA [23].

Tabla 3. Primers usados para real time-PCR		
GM3-s	Forward	5'-GGTCAGGGTCCACATAATGC-3'
	Reverse	5'-GCTTGTGTTTGGAGTGTGGA-3'
UGCG	Forward	5'-AGACACCTGGGAGCTTGCTA-3'
	Reverse	5'-TTCGTCCTCTTCTTGGTGCT-3'
grp94	Forward	5'-TCCGCCTTCCTTGTAGCAGATA-3'
	Reverse	5'-TTGTCGTTCCCCGTCCTAGA-3'
GADPH	Forward	5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAAA-3'
	Reverse	5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT-3'
GD3-s	Forward	5'-GTGGTATGACGGGGAGTT TT-3'
	Reverse	5'-GGCATGGATTCTCTACT TT-3'

Detección de gangliósido GM1 por Dot Blot

Cultivos celulares tratados o no con siRNAs, fueron lisados con buffer de lisis (50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.1% Triton X-100). La cantidad de proteína total se determinó mediante el reactivo de Bradford siguiendo las indicaciones del fabricante (Bio-Rad, USA). El aparato Bio-Dot se montó según instrucciones del fabricante (Bio-Rad, USA) con membrana de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, Mass.). Las muestras fueron aplicadas a la membrana en cantidades iguales referidas a proteína total o con cantidades conocidas de gangliósido comercial GM1 (Sigma). Se dejó secar la membrana y se incubó con solución de bloqueo (5% leche libre de lípidos en PBS) por 1hr en agitación constante. La solución de bloqueo se retiró y se incubó con CTB-peroxidasa (1:3000). El revelado de la peroxidasa se realizó con el kit Western Lightning Chemiluminescence siguiendo las instrucciones del fabricante (Perkin Elmer Life Sciences, USA).

Detección de GM1 por ELISA

Cultivos de células MA104 fueron lisados con buffer de lisis. La cantidad de proteína total se cuantificó mediante el reactivo de Bradford según instrucciones del fabricante (Bio-Rad, USA). Placas Costar de High-Binding de 96 pozos (Corning, NY) fueron incubadas overnight a 4° C con cantidades iguales de muestra referidas a proteína total o con cantidades conocidas de gangliosido GM1 (Sigma). Posteriormente las placas fueron lavadas con PBS e incubadas con solución de bloqueo (3% BSA en PBS) por 2h a 37° C. Se retiró la solución de bloqueo y se lavaron las placas, a continuación se incubaron con CTB acoplada a biotina (1:1000 en PBS-1% BSA) por 2 h a 37° C. Las placas se lavaron y se incubó ahora con Streptavidina acoplada a peroxidasa (1:3000 en PBS-1% BSA) por 1 h a 37° C. El revelado de la peroxidasa se realizó incubando 10 min en oscuridad con el sustrato cromogénico ortofenil-diamina siguiendo instrucciones del fabricante (Sigma, St. Louis, Mo.), la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1N y se determinó la densidad óptica midiendo absorbancia a 490 nm. Para establecer los blancos, se utilizaron las lecturas obtenidas de pozos incubados sólo con búfer de lisis (sin muestra) y posteriormente: sólo CTB o sólo Streptavidina.

Inmunodetección de otros receptores de rotavirus

Cultivos celulares tratados con siRNAs fueron lisados en buffer de carga (50 mM tris-HCl pH 6.8%, 2% SDS. 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol) con o sin β -mercapto-etanol (ya que el anticuerpo α -integrina β 3 reconoce un epítotope con puentes disulfuro). Cantidades similares de proteína fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, Mass.). Las membranas fueron incubadas en solución de bloqueo por 1h e incubadas a 4°C con anticuerpo primario correspondiente (α -integrina α 2, α -integrina β 3, α -hsc70 o α -vimentina) en PBS + 0.1% leche, seguido por la incubación con anticuerpo secundario especie-específico acoplado a peroxidasa. El desarrollo de la peroxidasa se realizó con el kit Western Lightning Chemiluminescence (Perkin-Elmer Life Sciences, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Infectividad de rotavirus en células con tratamiento de RNAi.

Para evaluar la infectividad después de la inhibición de síntesis de gangliósidos, las monocapas de células fueron lavadas con MEM sin suero y posteriormente inoculadas con virus por 1h a 37° C a una dilución que produce 2000 FFU por pozo. El inóculo fue retirado y los cultivos fueron lavados con MEM sin suero e incubados por 14h a 37° C para detección de FFU como se describe anteriormente.

Ensayos de unión de rotavirus a cultivos celulares.

Células MA104 cultivadas en placas de 48 pozos fueron lavadas dos veces e incubadas con MEM sin suero por 30 min a 37° C. Posteriormente el medio fue removido y se añadieron 500 µl de solución de bloqueo (PBS-BSA 1%) por 1h a 37° C. Las células fueron lavadas dos veces con solución de lavado (PBS-BSA 0.5%) en frío e inoculadas por 1h a 4° C con 2µg de TLPs purificadas y diluidas en MEM frío, como se menciono anteriormente, rotavirus puede unirse a las células a 4°C pero requiere de una temperatura de ~37°C para ser internalizado [33]. Las células fueron lavadas dos veces con solución de lavado y lisadas con 50µl de búfer de lisis. El lisado celular fue congelado-descongelado dos veces y la cantidad de virus presente en el lisado fue determinada por ensayo inmuno-enzimático (ELISA) como se describe a continuación.

Ensayo inmunoenzimático para detección de rotavirus

Para la detección de rotavirus se utilizaron los anticuerpos policlonales de captura cabra- α -rotavirus (1:2000) y de revelado conejo- α -rotavirus (1:3000). Placas de 96 pozos de “high binding” (Costar Inc.) fueron incubadas con 100µl/pozo de anticuerpo de captura diluido en PBS a 37° C por una noche. Posteriormente las placas fueron bloqueadas por incubación con 200µl de PBS-1% BSA por 2h a 37° C. Las placas fueron lavadas con PBS e incubadas con 50µl/pozo de las muestras obtenidas por el ensayo de unión a 4° C toda la noche. Las placas fueron lavadas y el virus presente se detectó con 50µl/pozo del anticuerpo policlonal conejo- α -rotavirus (como se mencionó anteriormente) diluido en PBS-0.5 % BSA por 90min a 37° C. Finalmente se lavaron las placas con PBS y se incubaron con 50µl/pozo de suero α -conejo acoplado a fosfatasa alcalina (1:1000) diluido en PBS-0.5 % BSA por 90min a 37° C. Las placas fueron lavadas y se añadió el sustrato de fosfatasa alcalina

Sigma 104 (Sigma, St Louis, Mo.) diluido en búfer de dietanolamina (100mM dietanolamina pH 9.4, 1 mM MgCl₂, 5mM azida de sodio), la absorbancia a 405 nm fue registrada con un Microplate Autoreader EL311 (Bio-Tek Instruments).

Lipofección de DLPs en células con tratamiento de RNAi.

DLPs purificadas fueron resuspendidas en EDTA (final 50mM) para asegurar solo la presencia de partículas de doble capa. Posteriormente se diluyeron a una concentración final de 15 µg/ml en MEM. Se mezcló el volumen equivalente a 1µg de DLPs con 2µl de lipofectamina y se llevó a un volumen final de 100 µl, se dejó incubar la mezcla por 20 min a temperatura ambiente (TA). Cultivos de células interferidas (siIrr, siUGCG y siGM3-s) por 72 h fueron lavadas con MEM e incubadas por 1h a 37°C con la mezcla de DLPs. Cumplido el tiempo la mezcla de lipofección se retiró y los cultivos se incubaron en MEM por 14 h para posterior detección de FFU como se describe anteriormente.

Detección de GM1 y NSP2 por Inmunofluorescencia

Células MA104 crecidas sobre cubre-objetos y lipofectadas con siRNAs (siIrr, siUGCG y siGM3-s) como se describe anteriormente, fueron inoculadas por 1 h con una multiplicidad de infección (MOI) de 5 para las cepas RRV, TFR-41, Wa y UK. El inóculo fue retirado y los cultivos fueron incubados en MEM por 8h a 37° C. Las células fueron fijadas con 2% de paraformaldehído en PBS por 20 min a 37° C. Después de realizar lavados con solución de lavado (PBS-50 mM NH₄Cl), se permeabilizaron mediante incubación con PBS-0.5% Tritón X-100-50mM NH₄Cl por 15 min a TA. Se repitieron los lavados y se incubaron en solución de bloqueo (sol. lavado-1% BSA) overnight a 4° C. Se retiró la solución de bloqueo y se incubó por 1h a TA con anticuerpo primario α-NSP2 (1:200) diluido en solución de bloqueo. El anticuerpo primario se lavó con PBS-50 mM NH₄Cl y entonces se incubó por 1h a TA con anticuerpo secundario α-ratón acoplado al fluoróforo Alexa-586 y CTB-Alexa-488 diluidos en solución de bloqueo (1:500 y 1:2000 respectivamente). Se retiraron los anticuerpos acoplados a fluoróforos y se incubó por 1 min con DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol) para tinción de núcleos, las células fueron lavadas cuatro veces y los cubreobjetos fueron montados sobre laminillas con Fluorprep (BioMerieux, Inc. Durham, NC). Las laminillas fueron analizadas con un microscopio de

epifluorescencia Nikon E600 acoplado a una cámara Nikon DXM1200. Las imágenes fueron capturadas digitalmente y preparadas en Adobe Photoshop CS2, como se ha descrito anteriormente [35].

Ensayo de bloqueo de la infectividad de rotavirus.

Gangliósidos exógenos fueron diluidos de forma serial en MEM sin suero (concentración inicial de 100 µg/ml). Se mezclaron cantidades iguales de gangliósido con virus y como control virus sin gangliósidos. La mezcla incubó por 1h a 37 ° C, con agitación suave cada 15 min. Posteriormente la mezcla fue añadida a cultivos confluentes de células MA104 crecidas en placas de 96 pozos previamente lavadas con MEM sin suero. Se permitió la adsorción del virus incubando 1h a 37° C. Se retiró el inóculo y se lavó el cultivo con MEM sin suero. Se incubó por 14 h a 37° C para detección de FFU como se describió anteriormente.

RESULTADOS

El tratamiento con RNAi disminuye eficazmente los RNA mensajeros de las enzimas UGCG y GM3-s

Para disminuir la presencia de gangliósidos celulares, la estrategia consistió en eliminar la síntesis de dos proteínas involucradas en diferentes pasos de la biosíntesis de gangliósidos (UGCG y GM3-s) mediante RNAi. Sin embargo, hasta el momento no se encuentran disponibles anticuerpos comerciales para la detección de las proteínas de nuestro interés, por lo tanto para corroborar el efecto del tratamiento con RNAi se analizó el nivel de los RNA mensajeros (mRNA) que codifican a dichas enzimas por RT-PCR en tiempo real. Se extrajo RNA mediante Trizol de cultivos confluentes de células MA104 lipofectadas por 72 h y se determinó la cantidad de mRNA. La disminución fue determinada normalizando la relación de mGAPDH (control endógeno) entre mRNA de interés de cada tratamiento respecto al siRNA irrelevante (siIrr diseñado contra Luciferasa).

Se observó que los tratamientos con siUGCG y siGM3-s disminuyeron hasta un 80% el nivel de su mRNA blanco respectivo (Fig 8), aunque es importante de notar que la interferencia de la enzima UGCG además de disminuir su mRNA blanco tiene como consecuencia la disminución del mRNA de la enzima GM3-s y GD3-s y viceversa el tratamiento con siGM3-s disminuye el mRNA de la enzima UGCG y también de la enzima GD3-s. Este efecto ha sido observado anteriormente [70] y sugiere que los niveles de algunas transferasas son factores críticos de regulación que afectan la presencia de otras enzimas de la vía de síntesis de gangliósidos y sus mRNAs.

Como control interno se utilizó un siRNA dirigido hacia la proteína de retículo endoplásmico grp94 que es una chaperona involucrada en respuesta celular a estrés y cuyo silenciamiento se ha mostrado no tiene efecto sobre la infección con rotavirus [105]. En este trabajo, el sigrp94 no tuvo efecto alguno sobre los mRNAs de las proteínas UGCG y GM3-s; de forma complementaria, el mRNA de la proteína grp94 no se vió afectado por el tratamiento con los siUGCG y siGM3-s.

Estos resultados muestran la eficacia del tratamiento con siRNAs en reducir la cantidad de los mRNAs de las enzimas UGCG y GM3-s, y llevan a asumir que la síntesis de las enzimas disminuye de manera similar. El siguiente objetivo fue determinar si la producción

de gangliósidos también era afectada.

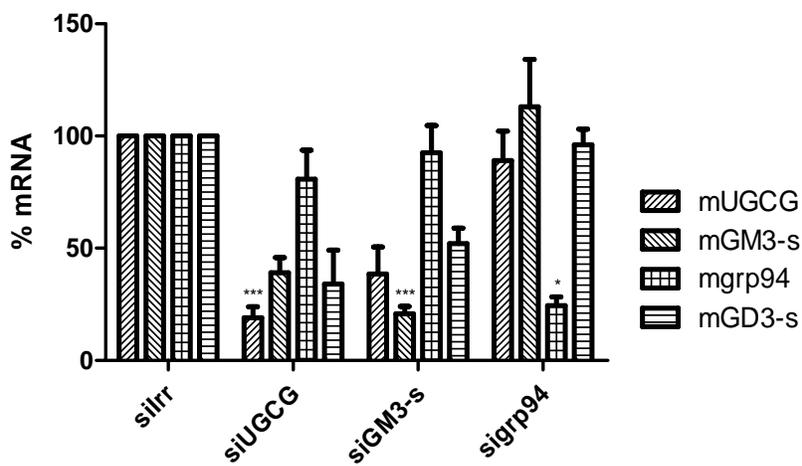


Fig. 8. Cuantificación de los mRNA que codifican las proteínas UGCG, GM3-s y grp94. Mediante RT-PCR en tiempo real se cuantificó el nivel de mRNA de las dos enzimas blanco del tratamiento con RNAi y dos controles internos: el mRNA de la proteína de retículo endoplásmico grp94 y el mRNA de otra proteína de la vía de síntesis de gangliósidos, GD3-s. Se muestra el porcentaje de mRNA detectado en cultivos celulares (n = 3) tratados con diferentes siRNAs (siIrr, siUGCG, siGM3-s, sigrp94). Las disminuciones están referidas a la relación de mGAPDH entre el mRNA interés por tratamiento de RNAi. Los experimentos (n=3) se realizaron por triplicado. *** p < 0.001, * p < 0.05.

Estandarización de la detección de gangliósido GM1.

Una forma sencilla y rápida de cuantificar gangliósidos celulares es utilizar la subunidad β de la toxina de cólera (CTB), la cual posee la característica de unirse específicamente al monosialogangliósido-1 (GM1). Se realizó la detección de GM1 mediante dot-blot con el uso de CTB acoplada a peroxidasa y mediante ELISA donde se utilizó CTB-acoplada a biotina. Estas pruebas se realizaron con la finalidad de escoger aquel ensayo que tuviera un mejor desempeño en la detección de gangliósido GM1.

Para establecer la capacidad de detección de GM1 por ambos ensayos, primero se realizaron curvas estándar desde 0.2 a 12 ng/ml de GM1. El rango óptimo de detección fue definido por las concentraciones de GM1 donde la regresión lineal de las lecturas daba la recta con el mejor valor de R^2 . El rango de concentraciones de GM1 detectables por ELISA (0.2 - 12 ng/ml) es mayor al rango detectable por dot-blot (0.2 - 1.5 ng/ml) (Fig. 9). La diferencia en el rango de detección de los dos métodos nos dió la posibilidad de adecuar la

detección del gangliósido a la técnica con mejor sensibilidad dependiendo de la muestra analizada. El siguiente paso fue analizar lisados de células MA104, como los que se obtendrían en el resto de los experimentos.

Se cuantificó la cantidad de proteína total en lisados de células MA104 por ensayo de Bradford o mediante la lectura a 280nm en el espectrofotómetro NanoDrop y se determinó la cantidad de GM1 presente en diferentes concentraciones de proteína (125-2000 ng/50 μ l) mediante las dos técnicas. La detección de GM1 por dot-blot fue eficaz en el rango de 125 – 500 ng de proteína, muestras con cantidades mayores de proteína mostraron saturación de la señal. Como se puede observar en la Figura 9 panel D, la muestra con 125 ng de proteína está por debajo del rango de concentraciones usadas en la curva estándar y aún así tiene una lectura positiva lo que sugiere que la curva estándar se podría extender más allá del límite inferior (0.2 ng de GM1), sin embargo esas concentraciones no se ensayaron.

Por otra parte la detección por ELISA no produjo lecturas positivas con ninguna concentración de proteína ensayada (Fig 9, panel B), este fallo en la detección posiblemente fue debido a la mayor afinidad y saturación de la placa de ELISA con otros productos celulares presentes en el lisado, ya que los glicosfingolípidos conforman una fracción muy pequeña respecto a otras macromoléculas como las proteínas.

Si bien la detección de GM1 comercial por ELISA fue factible y presenta un mayor rango de detección que el dot-blot, las muestras manejadas en este trabajo posiblemente no están procesadas de forma adecuada para este ensayo, a diferencia de lo observado en la detección por dot-blot (Fig. 9), que parece ser la técnica más adecuada para el tipo de muestras obtenidas en el presente proyecto y fue utilizada como la técnica predeterminada de detección de GM1, sirviendo de apoyo y corroboración a las demás técnicas desarrolladas.

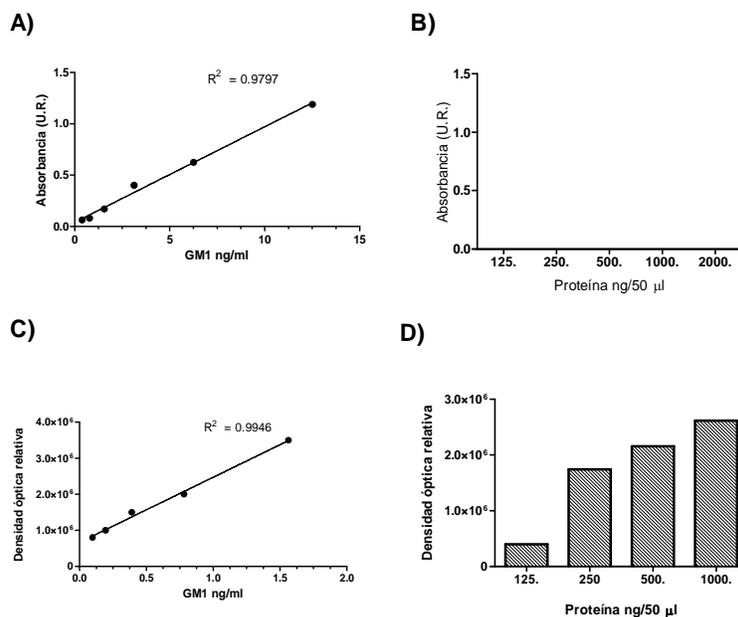


Figura 9. Estandarización de la detección de gangliósido GM1 mediante ELISA y dot-blot. Se muestran las curvas estándar realizadas para ambas técnicas con gangliósido GM1 comercial, en el panel A la detección se realizó por ELISA y en el panel C la detección se realizó por dot-blot. Las concentraciones donde se obtuvo la mejor regresión lineal fueron 0.2 - 12 ng/ml para ELISA y 0.2 - 1.5 ng/ml de GM1 para dot-blot. Para evaluar las muestras que serían utilizadas en este trabajo, distintas concentraciones de proteína en lisados de células MA104 se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para detectar GM1 por ELISA con CTB-biotina (panel B) o con CTB-peroxidasa (panel D).

Efecto de la inhibición de las enzimas UGCG y GM3-s sobre la presencia de gangliósidos celulares.

Una vez establecido el método de dot-blot para detectar los niveles de GM1 en lisados de cultivos celulares, se aplicó a las muestras obtenidas en los ensayos de interferencia de RNA de las enzimas UGCG y GM3-s. Ya que estas enzimas participan en la síntesis de gangliósidos, se esperaba que su silenciamiento tuviera como consecuencia la disminución de su producto, los gangliósidos celulares.

Lograr la disminución de gangliósidos mediante interferencia del mRNA de las enzimas que los producen requiere no solo de la efectividad del siRNA diseñado, sino de varios procesos adicionales. En primer lugar, la degradación de las enzimas pre-existentes al tratamiento que seguirán sintetizando gangliósidos hasta que la célula las degrade y posteriormente, esperar a que el producto existente (gangliósidos) cumpla a su vez su función/vida media y sea degradado también.

Cabe mencionar que no existen datos sobre la vida media de los gangliósidos de células MA104 (utilizadas en este trabajo) y por tanto debíamos asumir que la vida media de los gangliósidos como se mencionó anteriormente, podría variar entre dos horas y tres días, además el funcionamiento de los siRNAs lipofectados es efectivo durante poco más de 96 hrs.

Con el objetivo de acelerar la disminución de las enzimas y gangliósidos existentes, se utilizaron cultivos celulares subconfluentes al momento de lipofectar. De esta forma, la degradación de mRNAs estaría activa cuando las células lipofectadas se dividieran y por lo tanto, la progénie recibiría menos enzimas y menos gangliósidos en comparación a una célula no lipofectada (o lipofectada con siIrr). Al no poder sintetizar enzimas *de-novo*, las enzimas y gangliósidos que reciba la progénie, cumplirían con mayor rapidez su función y/o vida media. Entonces se esperaba que al crecer el cultivo y completar una monocapa, la disminución de gangliósidos fuera más efectiva. Así se decidió evaluar la densidad celular a la que requerían ser lipofectados los cultivos para obtener al final del tratamiento una monocapa confluyente y carente en lo posible de gangliósidos.

El tratamiento de lipofección se realizó en tres densidades de cultivo diferentes: $\sim 1.04 \times 10^5$ células/ml (80% de confluencia), $\sim 9.1 \times 10^4$ células/ml (70% de confluencia) y $\sim 8.4 \times 10^4$ células/ml (60% de confluencia); y la cantidad de gangliósido GM1 fue determinada a las 72h de tratamiento con siRNAs. La interferencia de cultivos al 80% de confluencia mostró una interferencia insuficiente. En cambio el uso de cultivos con confluencias de 70% y 60% mostró disminución de GM1 celular en los tratamientos con siUGCG y siGM3-s. El siUGCG logró una disminución aproximada del 80% y el siGM3-s logró disminuir hasta por 60% la presencia de GM1 (Fig 10). Estos resultados nos muestran que lipofectar cultivos subconfluentes con siUGCG y siGM3-s si disminuye la cantidad de gangliósidos celulares. Para asegurar la máxima disminución de gangliósidos en los experimentos posteriores se estableció el uso de cultivos subconfluentes $\sim 60\%$ al momento de lipofectar.

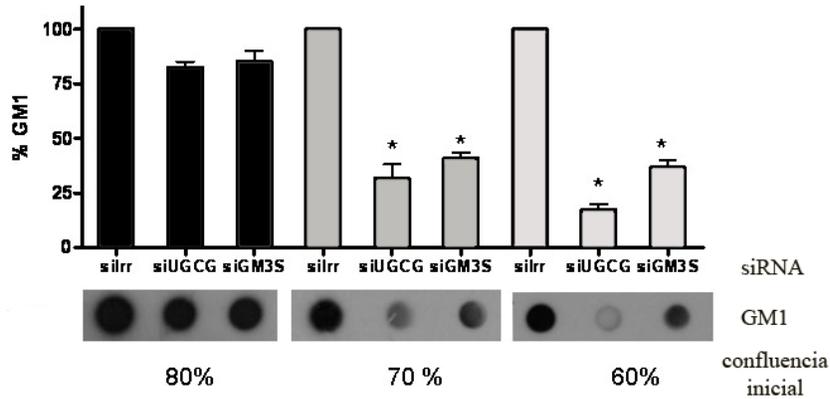


Figura 10. Efecto de la densidad celular sobre la inhibición de la síntesis de gangliósidos. Células sembradas a diferentes densidades (80%, 70% y 60%) fueron lipofectadas por 72 hrs, al término de esta incubación se lisaron las monocapas y se evaluaron los niveles de gangliósido GM1 mediante CTB. Se muestra la densitometría de la detección por blotting de GM1 en lisados celulares normalizados a 250 ng de proteína, la cantidad de GM1 de cada condición es referido al GM1 presente en el tratamiento con siilrr. Cada experimento (n = 3) se realizó por duplicado. * p < 0.05.

Efecto de la disminución de gangliósidos sobre la infectividad

Una vez verificada la eficacia del tratamiento con RNAi y la consecuente disminución de los gangliósidos celulares, el siguiente objetivo fue evaluar la susceptibilidad a la infección de las células deficientes de gangliósidos. Para esto se seleccionaron cuatro cepas de rotavirus que cubrieran todas las posibilidades respecto a dos características en el uso de receptores: la dependencia de integrinas y la susceptibilidad al tratamiento con neuraminidasa (Fig. 11).

Se observó que los tratamientos con siUGCG y siGM3-s disminuyeron la susceptibilidad de las células a la infección con las cuatro cepas en diferentes grados, desde 25% hasta 70%. El tratamiento con siUGCG tuvo como consecuencia una mayor disminución en comparación con siGM3-s en las cuatro cepas de rotavirus. Es importante notar que la disminución de gangliósidos en la célula afecta tanto a cepas sensibles como resistentes a neuraminidasa, lo que nos indica que la sensibilidad a neuraminidasa no es un factor que determine la participación de gangliósidos en la entrada de rotavirus.

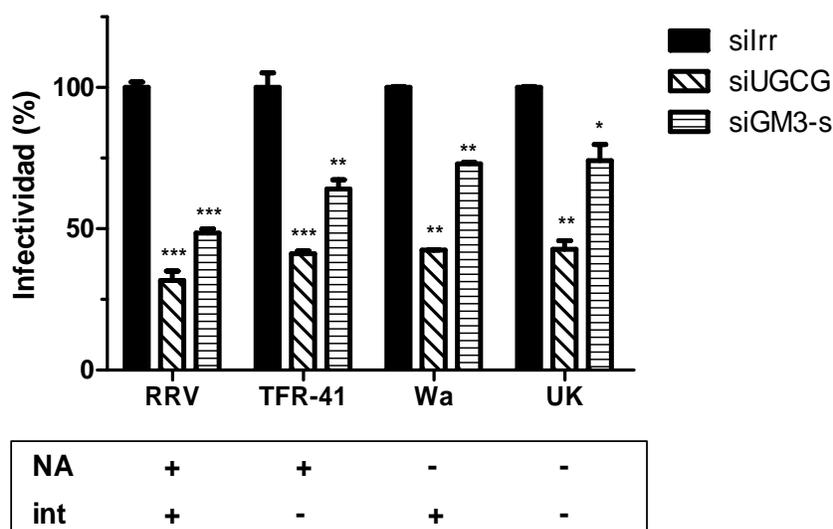


Figura 11. Efecto de la inhibición de síntesis de gangliósidos sobre la infectividad de rotavirus. Cultivos con bajos niveles de gangliósidos fueron infectados con cuatro cepas de rotavirus. Se muestra en la gráfica el porcentaje de infectividad de cada cepa en los tratamientos con siUGCG y siGM3-s, con respecto al siIrr. En la tabla se resumen las características correspondientes a dependencia de integrinas (int) y susceptibilidad a neuraminidasa (NA). Los experimentos (n = 3) fueron realizados por duplicado. *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05.

Efecto de la disminución de gangliósidos en la unión de rotavirus a la célula.

En el primer paso de la infección, rotavirus se une a un receptor en la célula huésped, posteriormente interactúa con otras proteínas y se internaliza. Para evaluar si la disminución en la susceptibilidad a la infección era debida a la incapacidad del virus para unirse a la célula, se realizaron ensayos de unión en cultivos tratados con siRNAs. Estos ensayos mostraron que la disminución de gangliósidos no tuvo efecto sobre la unión de ninguna de las cuatro cepas de rotavirus a los cultivos celulares con ninguno de los siRNAs (Fig 12). Este es un resultado muy interesante, ya que a pesar de que está caracterizado que la primera interacción de rotavirus con la célula es a través de ácido siálico, estos ensayos sugieren que el ácido siálico presente en los gangliósidos no es indispensable para la unión, pero sí para la infección (Fig 11).

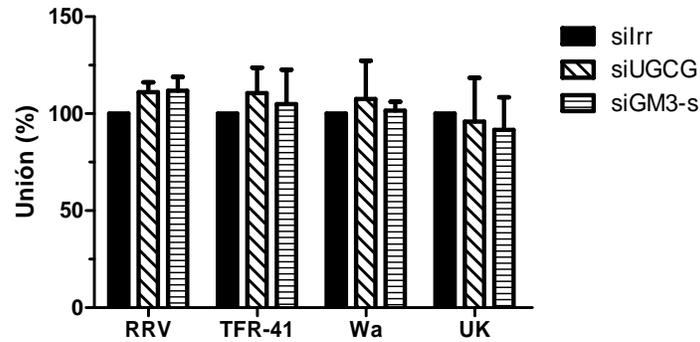


Fig 12. La disminución de gangliósidos celulares no afecta la unión del virus a la célula. Se determinó mediante ELISA, la unión de cuatro cepas de rotavirus a cultivos celulares con inhibición de síntesis de gangliósidos. Para cada cepa, el porcentaje de unión en los tratamientos con siUGCG y siGM3-s no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la unión en cultivos con tratamiento con siIrr. Los experimentos (n = 3) fueron realizados por duplicado.

La inhibición de la síntesis de gangliósidos no afecta la infección en pasos post-entrada.

Para asegurar que la disminución de la infectividad de rotavirus en células con bajos niveles de gangliósidos es un efecto a nivel de entrada, se realizó la lipofección de DLPs. Como se mencionó anteriormente, éstas son partículas que no son infecciosas pero sí transcripcionalmente activas si son introducidas artificialmente a la célula. Haciendo uso de esta característica, se cuantificó la producción de focos infecciosos a las 14 horas posteriores a la transfección de DLPs de RRV. En la Figura 13 se puede observar que los tratamientos con siUGCG y siGM3-s no tuvieron efectos negativos sobre la replicación del virus, ya que la cantidad de FFU producidos en las células con inhibición de síntesis de gangliósidos fue semejante a los FFU cuantificados en el control (cultivos tratados con siIrr). Este resultado indica que la disminución de gangliósidos no tiene efectos en etapas posteriores a la entrada.

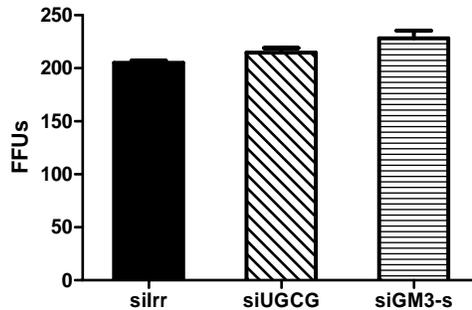


Figura 13. La disminución de gangliósidos celulares no afecta la replicación del virus. Cultivos de células con inhibición de síntesis de gangliósidos se transfectaron con DLPs de RRV y se detectó la producción de partículas virales. Se muestra el número de focos infecciosos producidos para cada siRNA utilizado. Los experimentos (n = 2) fueron realizados por triplicado.

Análisis por microscopía del efecto de la disminución de gangliósidos en la infectividad de rotavirus.

Los resultados anteriores muestran que las células con inhibición de la síntesis de gangliósidos disminuyen su susceptibilidad a la infección por rotavirus. Sin embargo, ya que el ensayo de infectividad es una evaluación a nivel poblacional y que las condiciones de lipofección de siRNAs no aseguran que absolutamente todas las células en un cultivo sean transfectadas (según un estimado en nuestro laboratorio sólo se alcanza un 90% de células lipofectadas), no se puede correlacionar directamente susceptibilidad a la infección con la ausencia de gangliósidos.

Sería muy arriesgado afirmar que al finalizar el tratamiento la detección de un foco infeccioso corresponda a una célula que posee niveles normales de gangliósido debido a que no fue transfectada y viceversa; no se puede afirmar que la célula que no fue infectada corresponda a una célula transfectada cuya síntesis de gangliósidos fue inhibida. Para correlacionar la inhibición de la síntesis de gangliósidos con la disminución en la susceptibilidad a la infección a nivel celular, se analizaron por microscopía cultivos de células con inhibición de síntesis de gangliósidos y posteriormente infectadas.

En la figura 14 se muestra el análisis por microscopía de la infección con cuatro cepas de rotavirus. Como se puede observar en los paneles con tratamiento con siIrr, el gangliósido GM1 (verde) fue abundante en células MA104 y se encuentra distribuido uniformemente en la membrana celular con patrón de “punteo”. Mediante la detección de

NSP2 (rojo) se puede observar que todas las células fueron infectadas en los paneles con tratamiento con siIrr. Cuando se trataron los cultivos con siUGCG, la cantidad de GM1 por célula disminuyó notablemente (como ya se había observado por dot-blot) pero la disminución no es total. Las disminuciones observadas fueron de diferentes grados, habiendo algunas que no presentaron disminución, lo que sugiere y confirma que no todas las células fueron lipofectadas con siRNA. Entonces para evaluar los cultivos con tratamiento con siUGCG se esperaba que las células que no presentaran GM1, tampoco presentaran infección y que las células que no disminuyeran su cantidad de GM1, posiblemente fueran infectadas.

Se observó que la infectividad de las cuatro cepas disminuyó en los tratamientos con siUGCG (como se había visto por ensayo de infectividad). En el caso de las cepas RRV y TFR-41, se observó que las células que presentaron menor cantidad de GM1 no fueron infectadas y que las células que expresaron mayor cantidad de GM1 (respecto a otras células del mismo tratamiento) fueron más susceptibles de ser infectadas (indicadas con flechas en Fig 14). Para las cepas Wa y UK, el panorama no es tan claro ya que en el tratamiento con siUGCG a pesar de haber células que tuvieron menos cantidad de GM1, fueron infectadas en lugar de aquellas que presentaron mayor cantidad de GM1 (indicadas con flechas en Fig 14).

Si bien la primer explicación que surge es que rotavirus no requiere de gangliósidos para infectar a la célula, cabe recordar que en estas microscopías la disminución de gangliósidos está representada solo por GM1 y que existen otras especies de gangliósidos que no son detectadas por CTB y por otro lado, ya que no se logró una depleción total de GM1 tal vez una mínima cantidad presente en la célula podría ser la causa de que el virus pueda realizar la infección.

Además, la población de células en los tratamientos con siUGCG en las que se observan cantidades de GM1 similares al control y que presentan infección, sugiere que la disminución en la susceptibilidad a la infección observada en los ensayos de infectividad puede estar subestimada, ya que éstas células al no estar lipofectadas no deberían tomarse en cuenta en el ensayo de infectividad y por lo tanto el efecto observado sería mayor y por tanto aumentaría la importancia de la participación de los gangliósidos en la infección por rotavirus.

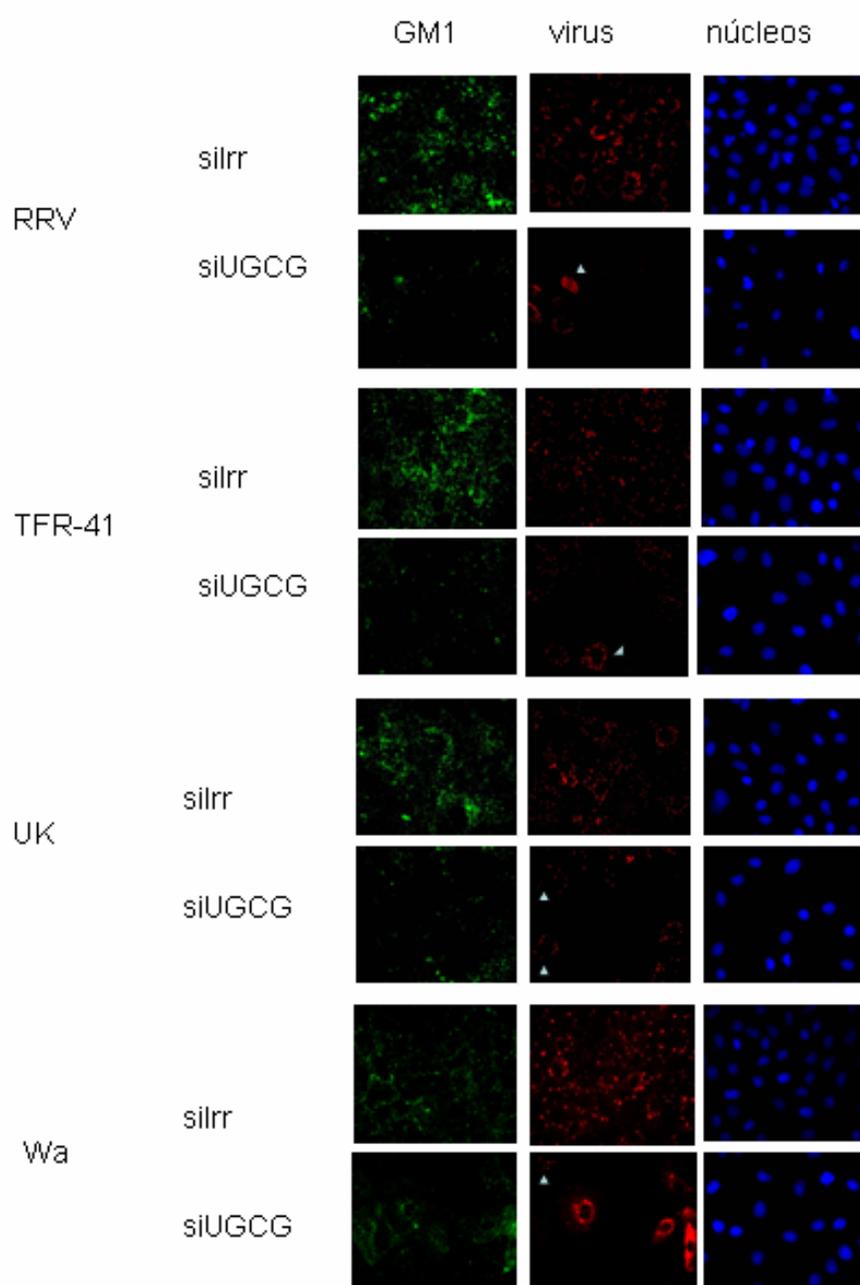


Figura 14. Análisis por microscopía del efecto de la disminución de gangliósidos sobre la infectividad de rotavirus. Células con inhibición de la síntesis de gangliósidos fueron infectadas con RRV, TFR-41, Wa o UK y fijadas a las 8 horas post infección para detección de GM1 (verde), la proteína viral NSP2 (rojo), núcleos teñidos con DAPI (azul). Los tratamientos con siUGCG reducen notablemente la cantidad de GM1 y esta disminución correlaciona con la disminución en la infectividad de las cepas cuatro cepas.

La disminución de gangliósidos celulares no afecta la presencia de otros receptores virales

Como se explicó anteriormente, existen varias proteínas de membrana (hsc70, integrinas $\alpha 2$ y $\beta 3$) que participan en los primeros pasos de la infección por rotavirus. Para evaluar si la disminución de gangliósidos tenía algún efecto sobre la presencia de otros receptores virales, se realizó la inmunodetección de éstas proteínas. En la figura 15 se puede observar que la inhibición de la síntesis de gangliósidos (panel superior) no afecta la cantidad de éstos receptores de rotavirus. La proteína vimentina fue utilizada como control de carga.

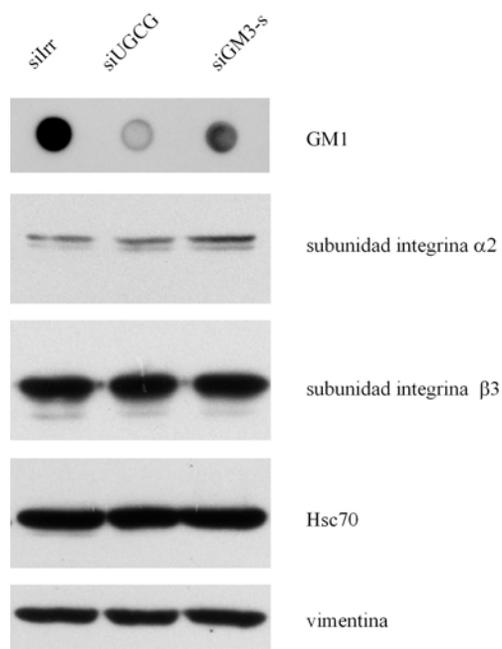


Figura 15 Presencia de otros receptores de rotavirus en células con inhibición de síntesis de gangliósidos. Se muestra la cantidad de GM1 presente en cultivos celulares con tratamiento de RNAi, en estos cultivos se realizó también la inmunodetección de tres proteínas involucradas en la entrada de rotavirus: subunidad de integrina $\alpha 2$, subunidad de integrina $\beta 3$ y hsc70. Como control de carga se muestra la detección de vimentina.

La preincubación con gangliósidos disminuye la infectividad de rotavirus

En los resultados anteriores se demostró que la disminución de gangliósidos hace menos susceptible a las células de infectarse con rotavirus y se sabe que rotavirus puede interactuar con gangliósidos en una placa de cromatografía en capa fina [99]. Por lo tanto podría interactuar con al menos un tipo de gangliósido durante el proceso de entrada a la célula. Sin embargo, como se explicó anteriormente, una célula puede expresar varias especies de gangliósidos. Para determinar qué especies de gangliósidos interactúan con las cuatro cepas de rotavirus ensayadas, se analizó la capacidad de gangliósidos específicos para bloquear la infección mediante la incubación con rotavirus previa a la inoculación de los cultivos. Esta aproximación se denomina ensayo de bloqueo.

Ante la gran variedad de gangliósidos que una célula puede sintetizar (en este caso la línea celular MA104), se escogió un juego de siete especies de gangliósidos con base en la cantidad y posición de residuos de SA, agrupándose de la siguiente forma: Grupo 1, un glicoesfingolípido neutro, es decir no contiene residuos de SA: asialo-GM1 (GA1); Grupo 2, gangliósidos con un residuo de SA: monosialogangliósido GM3 que contiene un residuo de SA externo, monosialogangliósidos GM2 y GM1 con un residuo de SA interno; Grupo 3, gangliósidos con dos residuos de SA, disialogangliósido GD3 con los residuos unidos consecutivamente en posición externa, disialogangliósido GD1b con los residuos de SA unidos consecutivamente en posición interna y disialogangliósido GD1a con un residuo SA interno y un residuo SA externo (Fig. 6).

La preincubación con el primer grupo (neutro) no disminuyó la infectividad de ninguna de las cuatro cepas (Fig 16). En el grupo 2, la preincubación con el gangliósido GM3 (residuo SA externo) provocó una disminución en la infectividad de una forma dependiente de concentración en las cepas RRV y TFR; Wa solo disminuyó 30% y UK no presentó bloqueo alguno. Los gangliósidos con un residuo de SA interno (GM1 y GM2) disminuyeron la infectividad de las cuatro cepas de rotavirus ensayadas en diferentes grados, las cepas más afectadas fueron RRV y TFR-41 donde la infectividad disminuyó hasta 75% y 95% respectivamente, la infectividad de las cepas Wa y UK se bloquearon gradualmente hasta un máximo de 75% con la concentración más alta de GM1. El gangliósido GM2 bloqueó gradualmente todas las cepas, RRV y TFR-41 se afectaron en

más del 90%, mientras que la infectividad de las cepas Wa y UK disminuyó hasta 50% (Fig. 16).

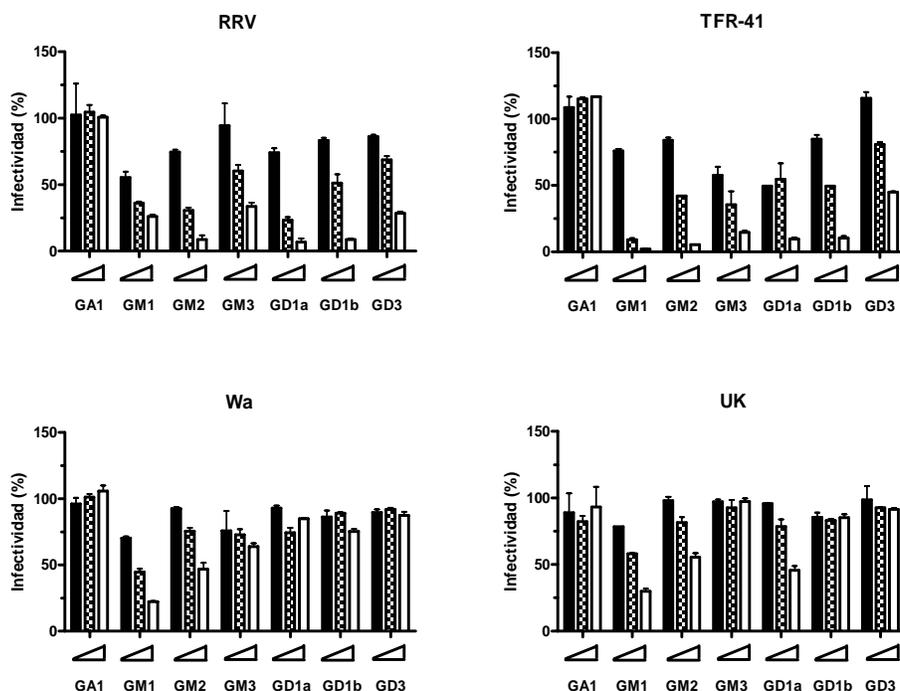


Figura 16. Efecto de la preincubación con gangliósidos sobre la infectividad de rotavirus. Cuatro cepas de rotavirus fueron incubadas con concentraciones graduales (1.5, 12.5 y 50 µg/ml) de diferentes gangliósidos y posteriormente esta mezcla fue inoculada a cultivos celulares, 14 horas post infección se realizó la detección de focos infecciosos. Se muestra el porcentaje de infectividad de cada cepa con las tres diferentes concentraciones de gangliósidos. Los resultados están referidos al número de focos obtenidos en el tratamiento control (virus sin gangliósidos). Los experimentos (n = 3) fueron realizados por duplicado.

En el grupo 3, conformado por gangliósidos con 2 residuos de SA, la infectividad de las cepas RRV y TFR-41 disminuyó drásticamente; más del 90% con GD1a y GD1b, disminuciones de 70% y 50% respectivamente con GD3, mientras que la infectividad de la cepa UK solo se bloqueó por la preincubación con el gangliósido GD1a (hasta 50%). Por su parte, la cepa Wa mostró disminución significativa en la infectividad con los gangliósidos GD1a y GD1b con un máximo de 25%.

Si se analiza en conjunto el efecto de la preincubación con gangliósidos, se pueden observar ciertos patrones en las cepas de rotavirus usadas. En general, los rotavirus interactúan con gangliósidos que poseen al menos un residuo de SA. Los gangliósidos

con uno o dos residuos de SA, interaccionan principalmente con las cepas de rotavirus sensibles a neuraminidasa (RRV y TFR-41), mientras que las cepas NA⁻ (Wa y UK) presentan preferencia por gangliósidos con SA interno. Cuando los residuos de SA se presentan en ambas posiciones (GD1a), la infectividad de la cepa Wa es la única que no disminuye drásticamente, sugiriendo que la presencia del residuo externo impide la correcta interacción del virus con el residuo interno y por consecuencia no hay bloqueo de la infección. En resumen, las cepas NA⁺ presentan una gran inespecificidad por el tipo de gangliósido usado y el único requisito es que el gangliósido contenga SA. Las cepas NA⁻ son más selectivas, mostrando preferencia por los residuos internos. Para analizar los datos desde un panorama más general, en la Tabla 4 se presenta un resumen de resultados.

Tabla 4. Resumen y comparación de resultados				
	RRV	TFR-41	Wa	UK
Origen	simio	porcina	humana	bovina
Sensibilidad o uso de otros receptores				
NA	+	+	-	-
int	+	-	+	-
Infectividad				
siUGCG	+++	+++	++	++
siGM3-s	++	+	+	+
Unión	+	+	+	+
Replicación	+	+	+	+
Bloqueo				
GA1	-	-	-	-
GM3 (SA terminal)	++	++	+	-
GM1 (SA interno)	++	+++	+++	++
GM2 (SA interno)	+++	+++	++	+
GD1a (SA interno y terminal)	+++	+++	-	++
GD3 (2 SA terminales)	++	++	-	-
GD1b (2 SA internos)	+++	+++	-	-

Sensibilidad a neuraminidasa: + sensible; - no sensible.

Integrinas: + dependiente; - no dependiente.

Infectividad en células con inhibición de síntesis de gangliósidos: +++ aprox 75% de disminución; ++ aprox 50% de disminución; + aprox 25% de disminución; - sin disminución.

Unión de rotavirus a células inhibición de síntesis de gangliósidos: + hay unión; - no hay unión.

Replicación del virus en células inhibición de síntesis de gangliósidos: + si se replica; - no se replica.

Bloqueo de infectividad por pre-incubación con el gangliósido especificado: +++ aprox 75% de bloqueo; ++ aprox 50% de bloqueo; + aprox 25% de bloqueo; - sin bloqueo.

DISCUSION

Se ha descrito que la interacción de rotavirus con su célula huésped ocurre de forma secuencial e involucra un receptor sialidado, varias integrinas y la proteína hsc70 [15]. Entre las moléculas de membrana que poseen SA se encuentran las glicoproteínas y los gangliósidos. En lo que respecta a glicoproteínas, se ha demostrado que el uso de drogas que inhiben la glicosilación de proteínas no afecta la infectividad de rotavirus [34]. Por otra parte, en años recientes se ha reportado que los gangliósidos (glicolípidos de membrana sialidados), son utilizados como receptores por diversos virus [101-104, 106] y además, son capaces de interactuar con rotavirus *in vitro* [47, 84, 99, 107, 108]. Con el objetivo de evaluar el papel de los gangliósidos en la infección de células MA104 por rotavirus, en este trabajo se realizó la inhibición de la síntesis de gangliósidos mediante la interferencia de RNA de dos enzimas que participan en esta vía (UGCG y GM3-s).

El primer objetivo fue evaluar la efectividad del tratamiento de RNAi a diferentes niveles; mediante RT-PCR en tiempo real se cuantificaron los RNA mensajeros de las enzimas blanco (UGCG y GM3-s) y se observó que el tratamiento disminuía los mRNAs en ~80% respecto al mRNA de dichas enzimas encontrado en el tratamiento con el siIrr y normalizado al mRNA de un gen de expresión constitutiva (GAPDH). Sin embargo, el tratamiento no fue “específico” en sentido de que silenciar la enzima UGCG disminuyó también el mGM3-s, y silenciar la enzima GM3-s disminuyó el mUGCG. Mediante BLAST se verificó que las secuencias de los siRNAs fueran específicas para sus mRNAs blanco (datos no mostrados), por lo que se analizaron otros mensajeros para aclarar esta situación.

En algunos estudios se ha encontrado que los niveles de algunas enzimas de la vía de síntesis de gangliósidos son puntos críticos de regulación, afectando no sólo la producción de gangliósidos específicos sino además, la presencia de otras enzimas de la vía de síntesis de gangliósidos y sus mRNAs [68-70]. Para corroborar si los resultados obtenidos en este trabajo correspondían a un caso similar, se cuantificó el mRNA de otra enzima de la vía de biosíntesis de gangliósidos, la enzima GD3-s. Esta enzima sintetiza el gangliósido GD3 mediante la adición de un residuo de SA al gangliósido GM3. Los resultados del RT-PCR mostraron que silenciar UGCG o GM3-s además de disminuir su RNA mensajero blanco, también disminuyen el RNA mensajero de GD3-s. Estos resultados concuerdan con lo antes

mencionado y aportan interesantes preguntas sobre la regulación de la vía de biosíntesis de gangliósidos que no forman parte de este proyecto.

Por otra parte, el uso de estos interferentes (siUGCG y siGM3-s) no tuvo efecto sobre el mensajero de una proteína de retículo endoplásmico (grp94) que fue utilizada como control endógeno y viceversa, el RNA interferente sigrp94 no tuvo efecto sobre los mRNAs de proteínas de la vía de síntesis de gangliósidos (mUGCG, mGM3-s y mGD3-s). Con lo que podemos concluir que si bien el efecto final del RNAi no fue estrictamente específico, los efectos secundarios observados recaen únicamente sobre la vía de síntesis de gangliósidos por lo que se cumple el objetivo: irrumpir la síntesis de gangliósidos celulares.

Como segundo objetivo en la evaluación del tratamiento con RNAi, se comprobó que al no haber síntesis *de-novo*, los gangliósidos ya sintetizados disminuirían después de cierto tiempo al degradarse por cumplir su vida media o función. Se utilizó la CTB que reconoce de forma específica al gangliósido GM1 que como se explicó anteriormente, es un gangliósido abundante en la línea MA104 (Fig. 7). Se probaron dos técnicas distintas, ELISA y dot-blot.

Se realizaron curvas estándar para ambas técnicas usando GM1 purificado. Al realizar la curva estándar de detección de GM1, se observó que la detección mediante ELISA tuvo mayor rango de detección (0.2-12 ng/ml) en comparación con dot-blot (0.2 – 1.5 ng/ml). Sin embargo, al utilizar ambas técnicas con muestras similares a las que se obtendrían en los experimentos, la técnica con mejor desempeño fue el dot-blot donde inclusive se observó que tal vez la curva estándar pudo haberse extendido hacia concentraciones menores de GM1.

El ineficaz desempeño del ELISA pudo haberse debido a la siguiente situación. Cuando se habló de que el gangliósido GM1 es “abundante” nos referimos a que es el gangliósido predominante en la línea celular MA104. Sin embargo, la cantidad real de este glicolípido en la célula es muy poca comparada con el resto de las macromoléculas (otros lípidos, proteínas, etc.) que están presentes en los lisados celulares usados como muestras. La muestra utilizada para dot-blot o ELISA solo consiste en un lisado celular. Al contener la muestra todo el lisado celular es posible que las placas de ELISA se saturaran con los restos celulares que no eran de interés, imposibilitando la unión de suficientes cantidades de GM1 a la placa de ELISA. Tal vez con un procesamiento diferente de las muestras, que incluyera

enriquecimiento o extracción de lípidos, la detección por ELISA obtendría mejores resultados, pero ya que el dot-blot se representaba como una técnica muy sencilla y eficaz, se escogió como comprobación del tratamiento de RNAi en posteriores experimentos.

Una vez que se comprobó la efectividad del RNAi y establecida una técnica para detectar un gangliósido representante, el siguiente punto fue lograr la máxima disminución de gangliósidos en el cultivo celular. Como se vió anteriormente, el metabolismo de los gangliósidos varía dependiendo de factores como el tipo celular y la etapa de vida de la célula. Por lo tanto, se lipofectaron los siRNAs en cultivos con diferentes confluencias (80%, 70% y 60%) y se observó que utilizando cultivos con 60% de confluencia, al final del tratamiento (72h) de RNAi se obtenía la mayor disminución de gangliósidos y una monocapa celular confluyente necesaria para ensayos de infectividad (Fig. 10). La siguiente pregunta a resolver fue que efecto tendría este fenotipo celular sobre la infección con rotavirus.

Tomando en cuenta las características sensibilidad a neuraminidasa y dependencia de integrinas, en este trabajo se utilizaron 4 cepas de rotavirus que cubrieran las 4 combinaciones posibles para estas dos características (Fig. 11), y se ensayó su infectividad en células con síntesis de gangliósidos inhibida. Se observó que el tratamiento con los siUGCG y siGM3-s disminuyó la susceptibilidad de las células a infectarse con las cuatro cepas de rotavirus, aunque en diferentes grados, que fueron desde el 25% hasta el 75%. Estos resultados sugieren que diferentes gangliósidos podrían participar en la infección dependiendo de la cepa de rotavirus analizada reflejándose en los diferentes niveles de disminución de la infectividad de las diferentes cepas.

Ya que rotavirus interacciona con otras proteínas de membrana, se analizó mediante inmunodetección que los niveles de las subunidades de integrina $\alpha 2$ y $\beta 3$, y la proteína hsc70. Se observó que la inhibición de la síntesis de gangliósidos no afectó los niveles de estas proteínas en la célula (Fig. 15), aunque su localización específica en DMRs, estructuras donde se ha visto que coinciden éstas proteínas y el gangliósido GM1 [38], queda por comprobarse. Otros trabajos han mostrado que el bloqueo de las subunidades de integrinas con anticuerpos o con péptidos se han obtenido inhibiciones de la infectividad desde 20% hasta 40% [54-56, 58, 109, 110]. El bloqueo de la proteína de choque térmico hsc70 mediante anticuerpos monoclonales inhibe la infectividad de rotavirus

aproximadamente en 50% [59] y el uso de péptidos que se unen al dominio de unión-a-péptido presente en hsc70, logran bloquear la infectividad hasta 70% [61]. Esta diferencia en la sensibilidad del virus a la presencia de receptores en la membrana sugiere que la interacción de rotavirus con gangliósidos es de gran importancia para la infección, ya que las disminuciones en la infectividad observadas por falta de gangliósidos son mayores (hasta 75%).

Por su origen, se podría asumir que las cepas virales con un mismo huésped poseen las mismas características en uso y dependencia de receptores, por ejemplo, con respecto a la interacción con SA. Se ha observado que todas las cepas de rotavirus humanas disponibles son resistentes al tratamiento de los cultivos celulares con neuraminidasa [50]. Sin embargo, las neuraminidasas ensayadas hasta el momento no cortan todos los ácidos siálicos, ya que los residuos de SA pueden estar presentes en diversos tipos de enlace (α -2,3, α -2,6 y α -2,8) y posición dentro de la molécula sialada (internos o externos). Por lo que no se puede afirmar que exista una dependencia real de residuos de SA por rotavirus como veremos a continuación.

Se ha reportado que la infectividad de las cepas humanas KUN y MO no se ve afectada por tratamiento con neuraminidasa de *A. Urefaciens*, la cual no hidroliza al gangliósido GM1 (contiene residuo de SA interno) en células MA104. La forma en la que se ve afectada la infectividad de éstas cepas es mediante ensayos de preincubación con GM1, obteniendo reducciones de hasta 80%. De esta forma concluyen que las cepas humanas de rotavirus NA⁻, KUN y MO, utilizan al gangliósido GM1 durante la infección [84]. Una conclusión similar se obtuvo del análisis por espectroscopia por RMN de la interacción de las proteínas VP7 de una cepa NA⁻ (Wa) y una cepa NA⁺ (CRW8) con las fracciones glucídicas de los gangliósidos GD1a y GM1. Donde la cepa NA⁻ mostró reconocer específicamente el residuo de SA interno en GM1, pero no el terminal en GD1a. La cepa NA⁺ presentó el caso contrario, mostró interacción con el SA terminal (GD1a), pero no con el SA interno (GM1) [107, 108].

En este trabajo se utilizó la cepa humana Wa que está clasificada como NA⁻. Se observó que la inhibición de la síntesis de gangliósidos disminuyó en un máximo de 60% la infectividad de Wa, lo que indica que existe por lo menos un gangliósido participando en la infección por esta cepa. Los ensayos de bloqueo nos sugieren que GM1 (~80% de bloqueo)

o GM2 (~50% de bloqueo), ambos con SA interno, podrían ser los candidatos. Estos resultados correlacionan con los trabajos previamente mencionados [84, 107, 108].

En cuanto a cepas porcinas, se ha reportado que la cepa OSU se une preferencialmente al gangliósido NeuGc-GM3; también se une, pero en menor proporción, a la forma ácida NeuAc-GM3 [98]. La cepa porcina OSU es NA^+ , al igual que la cepa porcina TFR-41. En este trabajo se observó que la inhibición de la síntesis de gangliósidos afecta la infectividad de la cepa TFR-41 en un máximo de 60%. Mediante ensayos de bloqueo de los gangliósidos GM1, GM2, GM3, GD1a, y GD1b, se disminuyó de forma drástica la infectividad hasta un 95%, lo que indica una fuerte interacción de TFR-41 con diferentes gangliósidos, no importando la posición en que se encuentre el residuo de SA. El único gangliósido que no tuvo un efecto tan importante (~50% de disminución) es el gangliósido GD3 que, tal vez por su doble SA, no interacciona con tanta facilidad debido a un impedimento estequiométrico.

Estudios con extractos de lípidos de intestino de puerco neonato mostraron que en esta especie predominan dos gangliósidos que difieren sólo en el tipo de SA: La forma NeuGc-GM3 que comprende el 75% de lípidos sializados y la forma ácida NeuAc-GM3, juntas abarcan casi el 100% de los lípidos sializados. Sin embargo, durante las primeras 16 semanas de vida, este perfil se modifica decayendo de forma drástica la cantidad de estos gangliósidos [98]. La correlación entre el perfil de gangliósidos en el intestino de puerco, la susceptibilidad a la infección en las primeras semanas de vida y las características de unión del virus y bloqueo de la infectividad con gangliósido GM3, son evidencia de la importancia de los gangliósidos en la infección por rotavirus.

De forma similar, el trabajo de Cecile Delorme reporta cuál es la preferencia de unión de las cepas bovinas NCDV y UK a glicoesfingolípidos sobre placas de TLC [99]. Cabe resaltar que aunque ambas son cepas bovinas, se escogieron porque presentan diferencias en la sensibilidad a NA. Mientras NCDV es NA^+ , la cepa UK es NA^- . En este caso, la cepa utilizada en este proyecto (UK), mostró preferencia por los gangliósidos NeuAc-GM3 y GM1, mientras que no mostró unión a NeuGc-GM3.

Nuestros resultados muestran que en células con inhibición de la síntesis de gangliósidos, la infectividad de la cepa UK disminuye aproximadamente un 50%. De forma dependiente de dosis, se observó también que el bloqueo con GM1 disminuyó hasta un

75% la infectividad y la preincubación con GM2 y GD1a provocó una disminución en la infectividad hasta ~50%. Sin embargo, la preincubación con gangliósido GM3 no mostró efectos sobre la infectividad, al igual que la preincubación con gangliósidos que presentan SA dobles (GD3 y GD1b).

Estos resultados son hasta cierto punto conflictivos con lo reportado por Delorme ya que, mientras correlacionan la unión y bloqueo de UK con el gangliósido GD1a (Fig. 16), contrastan la unión a GM3 propuesta por Delorme con la falta de bloqueo por el mismo gangliósido obtenida en este trabajo (Fig. 16). Aunque son técnicas diferentes (preincubación vs interacción en placas de TLC), ambas están basadas en la capacidad de interacción del gangliósido con el virus. Una posibilidad en la diferencia de resultados recae en la observación de que los experimentos de Delorme muestran que el gangliósido-GM3, al que se une UK corresponde a la forma ácida NeuAc-GM3 y resaltan que ésta unión no se presenta con la forma NeuGc-GM3. El gangliósido GM3 usado en este trabajo fue obtenido de la compañía Sigma y la información que se proporciona acerca del producto no especifica la estructura o fórmula del mismo, por lo que se asume que es la forma clásica, NeuAc-GM3.

Los resultados de Delorme también muestran unión de las cepas UK y NCDV al gangliósido GM2, lo cual es congruente con nuestros resultados, ya que observamos que el gangliósido GM2 logró un bloqueo del 50% en la cepa UK. Finalmente, el conjunto de nuestros resultados muestran la primera evidencia de que los gangliósidos GM1, GM2 y GD1a participan en la infección por rotavirus UK.

La cepa RRV representa un caso especial, ya que de las cuatro cepas ensayadas, es en la que la infectividad se ve afectada en mayor grado en células con inhibición de la síntesis de gangliósidos (~80%).

La preincubación con gangliósidos mostró que la cepa de simio RRV interacciona con gangliósidos que posean residuos de SA, independientemente de su posición (interna o terminal). El gangliósido que tuvo mayor efecto fue GD1a que posee un residuo interno y un residuo terminal. En la literatura se reportan estudios de otra cepa de rotavirus de simio (SA-11), la cual es NA⁺ y presenta interacción preferente con el gangliósido NeuGc-GM3, aunque también se une a otros gangliósidos como GM2 y GD1a [99]. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en este trabajo, por lo que el seguimiento y continuación de

los experimentos conducirá a la obtención de más conocimiento sobre los mecanismos de infección de rotavirus.

Es importante resaltar que las discrepancias observadas en la utilización y dependencia de receptores, podrían deberse al modelo celular de estudio, aunque las células MA104 son ampliamente utilizadas para el estudio de rotavirus, existen estudios con otras líneas celulares. Los trabajos y resultados que se analizaron en la discusión utilizan como línea principal MA104 [84, 98, 99].

En este trabajo se demostró que la inhibición de la síntesis de gangliósidos no afecta la síntesis de proteína viral, ya que al transfectar partículas de doble capa se logró detectar FFUs, indicando que los efectos observados por la eliminación de gangliósidos son a nivel de entrada del virus a la célula. De igual forma, mediante ensayos de unión pudimos observar que el tratamiento con los interferentes siUGCG y siGM3-s no tienen efectos negativos sobre la unión de las cuatro cepas de rotavirus a la célula, lo cual sugiere que los gangliósidos son importantes en procesos de entrada posteriores a la unión.

Nuestros resultados sugieren que para unirse a la célula, rotavirus podría utilizar ácido siálico de diversas fuentes (gangliósidos o glicoproteínas), ya que el primer objetivo en la infección es anclarse a una célula. En este caso, el receptor de unión podría no ser tan específico. Pero posteriormente requiere interactuar con gangliósidos específicos para llevar a cabo la entrada, tal vez para hacer cambios conformacionales en las proteínas de la capa externa y exponer algún péptido de fusión o para inducir señalización celular, ya que se ha visto que los gangliósidos pueden actuar en diferentes vías de transducción de señales [63, 64, 111]. En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el papel de los gangliósidos en la infección es mucho más importante de lo que se pensaba y se requiere de más aproximaciones experimentales para dilucidar todas las funciones que estas moléculas realizan durante la infección.

CONCLUSIONES

El tratamiento de cultivos celulares con siUGCG y siGM3-s disminuyó eficazmente la cantidad de gangliósidos celulares.

La disminución de gangliósidos celulares por interferencia de RNA de las enzimas que los sintetizan correlaciona con la disminución en la infectividad de cuatro cepas de rotavirus.

La disminución de gangliósidos celulares no tuvo un efecto negativo en la replicación de rotavirus RRV.

La disminución de gangliósidos celulares no tiene efectos negativos en la unión de rotavirus a la célula.

La infectividad de los rotavirus es disminuida al ser preincubados con gangliósidos.

Los gangliósidos GM1, GM2 y GD1a fueron identificados como moléculas involucradas en la infección por la cepa de rotavirus UK.

Los gangliósidos son moléculas muy importantes en la infección por rotavirus.

PERSPECTIVAS

La eliminación de cualquier molécula que posee normalmente una célula puede tener consecuencias adversas. En este trabajo se realizó la inhibición de la síntesis de gangliósidos mediante RNAi. Para confirmar y reforzar la evidencia sobre la integridad de la membrana celular deficiente de gangliósidos se propone: Analizar la composición e integridad de balsas de lípidos y evaluar la fluidez de la membrana.

Como se mencionó anteriormente, el perfil de gangliósidos que poseen las células MA104 está compuesto por varias especies de gangliósidos. Para obtener una mejor comprensión de la disminución de gangliósidos y su relación con la disminución de la infectividad de rotavirus, se propone analizar el perfil de gangliósidos en células con inhibición de síntesis de gangliósidos mediante cromatografía en capa fina. De esta forma, se podrá evaluar cuales especies persisten en la célula posterior al tratamiento de RNAi.

Entre las diversas funciones que tienen los gangliósidos esta la participación en vías de señalización. Esta característica podría ser aprovechada por rotavirus para realizar el proceso de entrada a la célula. Por lo tanto el análisis de activación de cascadas de señalización en las que participen gangliósidos representa una herramienta importante para este fin.

En este trabajo se observó que la susceptibilidad de una célula a la infección por rotavirus disminuye cuando se inhibe la presencia de gangliósidos en la membrana. Para tener un acercamiento mas preciso de cuales gangliósidos participan en la infección, se podría realizar la recuperación de la infectividad mediante la restitución de gangliósidos específicos a células deficientes. Otra forma de abordar este problema sería utilizar líneas celulares carentes de gangliósidos como los fibroblastos GM-95, en los cuales se esperaría favorecer la infectividad al restituir gangliósidos específicos en su membrana.

Estas son solo algunas de las estrategias experimentales que podrían ayudar a resolver las incógnitas que aún quedan sobre la participación de los gangliósidos en la infección por rotavirus. Y aunque cada respuesta parece llevar a una nueva pregunta, cada paso representa un aporte importante en la comprensión de un proceso natural que por complejo resulta tan interesante.

REFERENCIAS

1. WHO, *Annual number of deaths by cause for children under five years of age in WHO regions estimated for 2000-2003*, W.H. Organization, Editor. 2005.
2. Parashar, U.D., et al., *Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(5): p. 565-72.
3. Parashar, U.D., et al., *Rotavirus and severe childhood diarrhea*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(2): p. 304-6.
4. Estes, M.K., *Rotaviruses and their replication*, in *Fields Virology*, H.P. Knipe DN, Griffin DE, Lamb RA, Malcom MA, Roizman Band Strauss SE., Editor. 2007, Lippincot Williams and Williams: Philadelphia. p. 1917-1974.
5. Bass, D.M., et al., *Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus*. J Clin Invest, 1992. **90**(6): p. 2313-20.
6. Patton, J.T., et al., *Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome*. J Virol, 1997. **71**(12): p. 9618-26.
7. Boyle, J.F. and K.V. Holmes, *RNA-binding proteins of bovine rotavirus*. J Virol, 1986. **58**(2): p. 561-8.
8. Labbe, M., et al., *Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein*. J Gen Virol, 1994. **75** (Pt 12): p. 3423-30.
9. Li, Z., et al., *Rotavirus architecture at subnanometer resolution*. J Virol, 2009. **83**(4): p. 1754-66.
10. Gajardo, R., et al., *Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 2211-6.
11. Aoki, S.T., et al., *Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab*. Science, 2009. **324**(5933): p. 1444-7.
12. Yoder, J.D. and P.R. Dormitzer, *Alternative intermolecular contacts underlie the rotavirus VP5* two- to three-fold rearrangement*. EMBO J, 2006. **25**(7): p. 1559-68.
13. Arias, C.F., et al., *Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 5832-9.
14. Fiore, L., H.B. Greenberg, and E.R. Mackow, *The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin*. Virology, 1991. **181**(2): p. 553-63.
15. Lopez, S. and C.F. Arias, *Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance*. Trends Microbiol, 2004. **12**(6): p. 271-8.
16. Mackow, E.R., et al., *Characterization of homotypic and heterotypic VP7 neutralization sites of rhesus rotavirus*. Virology, 1988. **165**(2): p. 511-7.
17. Gunn, P.R., et al., *Rotavirus neutralizing protein VP7: antigenic determinants investigated by sequence analysis and peptide synthesis*. J Virol, 1985. **54**(3): p. 791-7.
18. Elleman, T.C., et al., *Nucleotide sequence of the gene encoding the serotype-specific glycoprotein of UK bovine rotavirus*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(14): p. 4689-701.
19. Barro, M. and J.T. Patton, *Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7*. J Virol, 2007. **81**(9): p. 4473-81.
20. Taraporewala, Z., D. Chen, and J.T. Patton, *Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase*

- activity. *J Virol*, 1999. **73**(12): p. 9934-43.
21. Piron, M., et al., *Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F*. *EMBO J*, 1998. **17**(19): p. 5811-21.
 22. Montero, H., C.F. Arias, and S. Lopez, *Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis*. *J Virol*, 2006. **80**(18): p. 9031-8.
 23. Lopez, T., et al., *Silencing the morphogenesis of rotavirus*. *J Virol*, 2005. **79**(1): p. 184-92.
 24. Zhang, W., et al., *Caveolin-1 inhibits epidermal growth factor-stimulated lamellipod extension and cell migration in metastatic mammary adenocarcinoma cells (MTLn3). Transformation suppressor effects of adenovirus-mediated gene delivery of caveolin-1*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(27): p. 20717-25.
 25. Fabbretti, E., et al., *Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo*. *J Gen Virol*, 1999. **80** (Pt 2): p. 333-9.
 26. Morris, A.P., et al., *NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca(2+)mediated I(-) influx into intestinal crypts of CF mice*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(2 Pt 1): p. G431-44.
 27. Blackhall, J., et al., *Serine protein kinase activity associated with rotavirus phosphoprotein NSP5*. *J Virol*, 1997. **71**(1): p. 138-44.
 28. Lopez, T., et al., *Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication*. *J Gen Virol*, 2005. **86**(Pt 6): p. 1609-17.
 29. Eichwald, C., J.F. Rodriguez, and O.R. Burrone, *Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation*. *J Gen Virol*, 2004. **85**(Pt 3): p. 625-34.
 30. Mattion, N.M., et al., *Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment II*. *Virology*, 1991. **181**(1): p. 295-304.
 31. Arias, C.F., et al., *RNA silencing of rotavirus gene expression*. *Virus Res*, 2004. **102**(1): p. 43-51.
 32. Arias, C.F., et al., *Molecular biology of rotavirus cell entry*. *Arch Med Res*, 2002. **33**(4): p. 356-61.
 33. Keljo, D.J. and A.K. Smith, *Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1988. **7**(2): p. 249-56.
 34. Guerrero, C.A., et al., *Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells*. *J Virol*, 2000. **74**(20): p. 9362-71.
 35. Sanchez-San Martin, C., et al., *Characterization of rotavirus cell entry*. *J Virol*, 2004. **78**(5): p. 2310-8.
 36. Gutierrez, M., *Datos no publicados*.
 37. Brown, D.A. and J.K. Rose, *Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface*. *Cell*, 1992. **68**(3): p. 533-44.
 38. Isa, P., et al., *Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry*. *Virology*, 2004. **322**(2): p. 370-81.
 39. McCrae, M.A. and G.P. Faulkner-Valle, *Molecular biology of rotaviruses. I. Characterization of basic growth parameters and pattern of macromolecular synthesis*. *J Virol*, 1981. **39**(2): p. 490-6.
 40. Lawton, J.A., et al., *Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer*. *J Virol*, 1997. **71**(10): p. 7353-60.

41. Ayala-Breton, C., et al., *Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNAi*. J Virol, 2009.
42. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 778-809, table of contents.
43. Patton, J.T. and E. Spencer, *Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses*. Virology, 2000. **277**(2): p. 217-25.
44. Altenburg, B.C., D.Y. Graham, and M.K. Estes, *Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells*. J Gen Virol, 1980. **46**(1): p. 75-85.
45. Chaibi, C., et al., *Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells*. Virology, 2005. **332**(2): p. 480-90.
46. Gardet, A., et al., *Role for actin in the polarized release of rotavirus*. J Virol, 2007. **81**(9): p. 4892-4.
47. Ciarlet, M., S.E. Crawford, and M.K. Estes, *Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains*. J Virol, 2001. **75**(23): p. 11834-50.
48. Smith, A.E. and A. Helenius, *How viruses enter animal cells*. Science, 2004. **304**(5668): p. 237-42.
49. Dimitrov, D.S., *Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(2): p. 109-22.
50. Ciarlet, M., et al., *Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 4087-95.
51. Isa, P., et al., *Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses*. J Virol, 1997. **71**(9): p. 6749-56.
52. Dormitzer, P.R., et al., *Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8* core*. J Virol, 2002. **76**(20): p. 10512-7.
53. Monnier, N., et al., *High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain*. J Virol, 2006. **80**(3): p. 1513-23.
54. Graham, K.L., et al., *Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry*. J Virol, 2003. **77**(18): p. 9969-78.
55. Guerrero, C.A., et al., *Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14644-9.
56. Hewish, M.J., Y. Takada, and B.S. Coulson, *Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells*. J Virol, 2000. **74**(1): p. 228-36.
57. Zarate, S., et al., *Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3*. Virology, 2000. **278**(1): p. 50-4.
58. Londrigan, S.L., et al., *Growth of rotaviruses in continuous human and monkey cell lines that vary in their expression of integrins*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 9): p. 2203-13.
59. Guerrero, C.A., et al., *Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 4096-102.
60. Zarate, S., et al., *Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5*. J Virol, 2003. **77**(13): p. 7254-60.
61. Perez-Vargas, J., *Datos no publicados*.

62. Hakomori, S., *Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling*. An Acad Bras Cienc, 2004. **76**(3): p. 553-72.
63. Proia, R.L., *Glycosphingolipid functions: insights from engineered mouse models*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2003. **358**(1433): p. 879-83.
64. Regina Todeschini, A. and S.I. Hakomori, *Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1780**(3): p. 421-33.
65. Tettamanti, G., *Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts*. Glycoconj J, 2004. **20**(5): p. 301-17.
66. Kolter, T., R.L. Proia, and K. Sandhoff, *Combinatorial ganglioside biosynthesis*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 25859-62.
67. Maccioni, H.J., C.G. Giraudo, and J.L. Daniotti, *Understanding the stepwise synthesis of glycolipids*. Neurochem Res, 2002. **27**(7-8): p. 629-36.
68. van Echten, G. and K. Sandhoff, *Ganglioside metabolism. Enzymology, Topology, and regulation*. J Biol Chem, 1993. **268**(8): p. 5341-4.
69. Lutz, M.S., et al., *Cloned beta 1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase synthesizes GA2 as well as gangliosides GM2 and GD2. GM3 synthesis has priority over GA2 synthesis for utilization of lactosylceramide substrate in vivo*. J Biol Chem, 1994. **269**(46): p. 29227-31.
70. Ruan, S., B.K. Raj, and K.O. Lloyd, *Relationship of glycosyltransferases and mRNA levels to ganglioside expression in neuroblastoma and melanoma cells*. J Neurochem, 1999. **72**(2): p. 514-21.
71. Ando, S., et al., *Turnover of myelin lipids in aging brain*. Neurochem Res, 2003. **28**(1): p. 5-13.
72. Harduin-Lepers, A., et al., *The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach*. Glycobiology, 2005. **15**(8): p. 805-17.
73. Xia, T., et al., *Sp1 and AP2 enhance promoter activity of the mouse GM3-synthase gene*. Gene, 2005. **351**: p. 109-18.
74. Yu, R.K. and E. Bieberich, *Regulation of glycosyltransferases in ganglioside biosynthesis by phosphorylation and dephosphorylation*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **177**(1-2): p. 19-24.
75. Yu, R.K., et al., *Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system*. J Lipid Res, 2004. **45**(5): p. 783-93.
76. Kim, K.W., et al., *Genomic structure of human GM3 synthase gene (hST3Gal V) and identification of mRNA isoforms in the 5'-untranslated region*. Gene, 2001. **273**(2): p. 163-71.
77. Puro, K., P. Maury, and J.K. Huttunen, *Qualitative and quantitative patterns of gangliosides in extraneural tissues*. Biochim Biophys Acta, 1969. **187**(2): p. 230-5.
78. Suzuki, C., A. Makita, and Z. Yosizawa, *Glycolipids isolated from porcine intestine*. Arch Biochem Biophys, 1968. **127**(1): p. 140-9.
79. Bouhours, J.F., D. Bouhours, and G.C. Hansson, *Developmental changes of gangliosides of the rat stomach. Appearance of a blood group B-active ganglioside*. J Biol Chem, 1987. **262**(34): p. 16370-5.
80. Keranen, A., *Gangliosides of the human gastrointestinal mucosa*. Biochim Biophys Acta, 1975. **409**(3): p. 320-8.
81. Ngamukote, S., et al., *Developmental changes of glycosphingolipids and expression of glycogenes in mouse brains*. J Neurochem, 2007. **103**(6): p. 2327-41.

82. Svennerholm, L., et al., *Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age*. Biochim Biophys Acta, 1989. **1005**(2): p. 109-17.
83. Forstner, G.G. and J.R. Wherrett, *Plasma membrane and mucosal glycosphingolipids in the rat intestine*. Biochim Biophys Acta, 1973. **306**(3): p. 446-59.
84. Guo, C.T., et al., *Ganglioside GM(1a) on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains*. J Biochem, 1999. **126**(4): p. 683-8.
85. Ichikawa, S., et al., *A mouse B16 melanoma mutant deficient in glycolipids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(7): p. 2703-7.
86. Hidari, K., et al., *Complete removal of sphingolipids from the plasma membrane disrupts cell to substratum adhesion of mouse melanoma cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(24): p. 14636-41.
87. Ostermeyer, A.G., et al., *Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane rafts in melanoma cells. methyl-beta-cyclodextrin does not affect cell surface transport of a GPI-anchored protein*. J Biol Chem, 1999. **274**(48): p. 34459-66.
88. Nagafuku, M., et al., *Reduction of glycosphingolipid levels in lipid rafts affects the expression state and function of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins but does not impair signal transduction via the T cell receptor*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51920-7.
89. Hakomori, S.I., *Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1780**(3): p. 325-46.
90. Masco, D., B. Flott, and W. Seifert, *Astrocytes in cell culture incorporate GM1 ganglioside*. Glia, 1989. **2**(4): p. 231-40.
91. Fishman, P.H., et al., *Modification of ganglioside GM1. Effect of lipid moiety on cholera action*. J Biol Chem, 1980. **255**(16): p. 7657-64.
92. Leskawa, K.C., et al., *Incorporation of exogenous ganglioside GM1 into neuroblastoma membranes: inhibition by calcium ion and dependence upon membrane protein*. Neurochem Res, 1989. **14**(6): p. 547-54.
93. Fishman, P.H., J. Moss, and V.C. Manganiello, *Synthesis and uptake of gangliosides by cholera-responsive human fibroblasts*. Biochemistry, 1977. **16**(9): p. 1871-5.
94. Ackerman, G.A., K.W. Wolken, and F.B. Gelder, *Surface distribution of monosialoganglioside GM1 on human blood cells and the effect of exogenous GM1 and neuraminidase on cholera toxin surface labeling. A quantitative immunocytochemical study*. J Histochem Cytochem, 1980. **28**(10): p. 1100-12.
95. Krishnaraj, R., Y.A. Saat, and R.G. Kemp, *Binding of monosialoganglioside by murine thymus cells in vitro*. Cancer Res, 1980. **40**(8 Pt 1): p. 2808-13.
96. Schwarzmann, G., *Uptake and metabolism of exogenous glycosphingolipids by cultured cells*. Semin Cell Dev Biol, 2001. **12**(2): p. 163-71.
97. Saqr, H.E., D.K. Pearl, and A.J. Yates, *A review and predictive models of ganglioside uptake by biological membranes*. J Neurochem, 1993. **61**(2): p. 395-411.
98. Rolsma, M.D., et al., *Structure and function of a ganglioside receptor for porcine rotavirus*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 9079-91.
99. Delorme, C., et al., *Glycosphingolipid binding specificities of rotavirus: identification of a sialic acid-binding epitope*. J Virol, 2001. **75**(5): p. 2276-87.
100. Superti, F. and G. Donelli, *Gangliosides as binding sites in SA-11 rotavirus infection*

- of LLC-MK2 cells. J Gen Virol, 1991. **72 (Pt 10)**: p. 2467-74.
101. Tsai, B., et al., *Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40*. EMBO J, 2003. **22**(17): p. 4346-55.
 102. Low, J.A., et al., *Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus*. J Virol, 2006. **80**(3): p. 1361-6.
 103. Schmidt, M. and J.A. Chiorini, *Gangliosides are essential for bovine adeno-associated virus entry*. J Virol, 2006. **80**(11): p. 5516-22.
 104. Taube, S., et al., *Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses*. J Virol, 2009. **83**(9): p. 4092-101.
 105. Maruri-Avidal, L., S. Lopez, and C.F. Arias, *Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles*. J Virol, 2008. **82**(11): p. 5368-80.
 106. Villar, E. and I.M. Barroso, *Role of sialic acid-containing molecules in paramyxovirus entry into the host cell: a minireview*. Glycoconj J, 2006. **23**(1-2): p. 5-17.
 107. Haselhorst, T., et al., *Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(2): p. 91-3.
 108. Kraschnefski, M.J., et al., *Effects on sialic acid recognition of amino acid mutations in the carbohydrate-binding cleft of the rotavirus spike protein*. Glycobiology, 2009. **19**(3): p. 194-200.
 109. Coulson, B.S., S.L. Londrigan, and D.J. Lee, *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, 1997. **94**(10): p. 5389-94.
 110. Isa, P., et al., *Dissecting the role of integrin subunits alpha2 and beta3 in rotavirus cell entry by RNA silencing*. Virus Res, 2009.
 111. Ledeen, R.W. and G. Wu, *Ganglioside function in calcium homeostasis and signaling*. Neurochem Res, 2002. **27**(7-8): p. 637-47.