



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO
Y FISIOLÓGÍA MOLECULAR**

**RECONSTITUCIÓN DE PARTÍCULAS
INFECCIOSAS DE ROTAVIRUS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

MARCO AURELIO DÍAZ SALINAS



DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS FEDERICO ARIAS ORTIZ

CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO.

OCTUBRE, 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 de tesis fue realizado en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Carlos Federico Arias Ortiz, en el laboratorio de los doctores Carlos F. Arias y Susana López (Laboratorio núm. 5, edificio “Sur”).

Durante la realización del mismo, se contó con el apoyo económico de CONACYT (becario núm. 207259), del proyecto SILANES P-198 del Dr. C.F. Arias y de la Unidad Administrativa del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Comité tutorial:

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera
Dr. Ramón Antonio González García-Conde
Dr. Carlos Federico Arias Ortiz

Jurado de examen:

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich
Dr. Baltazar Becerril Luján
Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama
Dr. Lorenzo Segovia Forcella
Dr. Carlos Federico Arias Ortiz

DEDICATORIAS

El presente trabajo de tesis está dedicado a las siguientes personas en agradecimiento por todo lo que me brindan y significan en mi vida:

- A Yvette por todo su amor, su apoyo, su comprensión y paciencia durante la realización de este trabajo. Por estos años de alegría y por ése matiz único que sólo Tú puedes implantarle a mi vida.
- A la memoria de Amparo Díaz. El recuerdo de tu apoyo y buenos deseos siempre estará presente conmigo.
- A mis padres por todo su amor y apoyo, por enseñarme a trabajar y a tratar de ser mejor cada día pero sobre todo, por enseñarme con su ejemplo a que no se debe de claudicar ante la adversidad por fuerte que ésta parezca. Todo lo bueno que tengo se los debo a Ustedes.
- A Fernando López, María de la Luz Díaz y a Fer por todo su cariño, confianza, enseñanzas y apoyo total durante la realización de este trabajo. Especialmente a María de la Luz por su ejemplo de afrontar a la adversidad con valentía.
- A mis hermanos Pepe y Alex por todo su cariño, amistad, apoyo y confianza, pero sobre todo, por su ejemplo de tenacidad que me brindan.
- A mi otro hermano del alma Rubén, por todos esos años de amistad, de apoyo incondicional, por darse el tiempo para escucharme y ser mi consejero. Por todas las batallas libradas.
- A la familia López Díaz por su apoyo y buenos deseos.

AGRADECIMIENTOS

A Carlos Arias por darme la oportunidad de conocer el fascinante mundo de la virología bajo su tutela, por sus enseñanzas y por todo el apoyo brindado.

A Susana López por todo el tiempo brindado, por su apoyo y por sus valiosas enseñanzas que sin duda alguna, tienen un gran peso en este trabajo de tesis y en mi formación académica.

A Pedro Romero por todas sus enseñanzas y consejos, por todo el tiempo dedicado, por ser el mejor de mis maestros en el IBT y sobre todo, por su valiosísima amistad.

A Rafaela Espinoza por ser una excelente maestra. Gracias por todas tus enseñanzas.

A Michelle, Vicenta e Hilda por su amistad, sus consejos y por todas sus enseñanzas.

A Tomás, Ernesto y Pavel por sus enseñanzas y por las valiosas críticas constructivas hacia este trabajo.

A los integrantes del laboratorio Arias/López: Los arriba mencionados, Lore, Silvia, Miguel O., MariLo, Tomás R., Liliana, Miguel M., Rosa, Rocío, Gaby, Daniela, Margaro, Lulú, Diana, Camilo, Marco E., Ivonne, Andrea, Luis, Alfonso, Marina, Diego, Gina, Héctor, Ana Paola, Jesús, Rodrigo.

A los integrantes de mi Comité Tutoral por sus consejos y críticas durante la realización del proyecto de tesis.

A los integrantes de mi jurado de examen por sus valiosas observaciones y consejos.

A Ruth Pastor por su valiosa asesoría sobre el cultivo de células de insecto.

A Alejandro Olvera por su valiosa ayuda y asesoría respecto a la cromatografía de afinidad a anticuerpos.

AGRADECIMIENTOS

(continuación...)

A Leopoldo Guereca por sus consejos respecto a la cromatografía de intercambio aniónico.

A Ricardo Castro por su asesoría con el cromatógrafo de líquidos durante los primeros intentos de purificación de VP4.

A Henry, Ramses, Martha, Fernando, Carlos, Kenia, Dámaris por su amistad y por las batallas libradas. *Vive la Résistance!*

A Adrián Izq., Anabel, Martha Alicia, Mabel, Ramces y Rivelino por su amistad, por los buenos momentos y por su apoyo.

A Gaby, Rocío, Raúl, Pablo, Gina, Celina y Elida por los buenos momentos.

A los integrantes de la Unidad de Docencia: Jalil, Gloria, Maribel y Antonio por su amabilidad y sobre todo por su eficiencia.

A los que me faltaron debido a mi fatiga mental (junto con una disculpa)...

A todos MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
ÍNDICE GENERAL	5
Abreviaturas	7
Índice de figuras	9
Índice de tablas	10
I. RESUMEN	11
II. INTRODUCCIÓN	13
II.1. Rotavirus	13
II.1.1. Generalidades	13
II.1.2. Genoma	14
II.1.3. Características de la partícula viral	16
II.1.4. Clasificación	18
II.1.5. La proteína VP4	18
II.1.6. La proteína VP7	21
II.1.7. Adsorción y entrada	24
II.2. Genética reversa	26
II.2.1. Género <i>Orthoreovirus</i>	27
II.2.2. Género <i>Orbivirus</i>	28
II.2.3. Género <i>Rotavirus</i>	28
III. ANTECEDENTES	31
III.1. Sistema baculovirus-células de insecto	31
III.1.1. Generalidades	31
III.1.2. Sistema Bac to Bac®	33
III.2. Alternativas a la genética reversa	35
III.2.1. Transcapsidación	35
III.2.2. Ensamble de Pseudo-Partículas Virales	36
III.2.3. Ensamble de TLPs	37
IV. JUSTIFICACIÓN	38
V. HIPÓTESIS	38
VI. OBJETIVOS	39
VI.1. Objetivo General	39
VI.2. Objetivos Particulares	39
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	40
VII.1. Líneas celulares y virus	40
VII.2. Determinación de los títulos virales	40
VII.3. Vectores y plásmidos	41
VII.4. Construcción de los baculovirus recombinantes	43
VII.5. Microscopía de inmunofluorescencia	43

ÍNDICE GENERAL

(continuación...)

	PÁGINA
VII.6. Ensayos de Western Blot	44
VII.7. Expresión de las proteínas recombinantes y preparación de “extractos crudos”	46
VII.8. Purificación de VP7 recombinante	47
VII.9. Purificación de VP4 recombinante	47
VII.10. Obtención de TLPs y DLPs	48
VII.11. Ensayos de reconstitución de TLPs	49
VII.12 Ensayos de infectividad	49
VIII. RESULTADOS	50
VIII.1. Construcción de baculovirus recombinantes	50
VIII.1.1. Construcción del BR de VP4 RRV	50
VIII.1.2. Construcción del BR de VP7 RRV	51
VIII.2. Expresión de VP4 y VP7 recombinantes	53
VIII.2.1. Expresión de VP4 RRV	53
VIII.2.2. Expresión de VP7 RRV	54
VIII.3. Purificación de VP7	55
VIII.4. Purificación de VP4	57
VIII.5. Reconstitución de TLPs	60
VIII.6. Infectividad de las TLPs reconstituidas	64
IX. DISCUSIÓN	66
IX.1. Construcción y expresión de las proteínas VP4 y VP7 recombinantes	66
IX.2. Purificación de VP7	68
IX.3. Purificación de VP4	69
IX.4. Reconstitución de TLPs e infectividad de las mismas	69
X. CONCLUSIONES	73
XI. PERSPECTIVAS	74
XII. REFERENCIAS	76

ABREVIATURAS

aa.- Aminoácido.

AcMNPV.- Nucleopoliedrovirus *Autographa californica*.

BR.- Baculovirus recombinantes.

BTV.- Bluetongue virus.

B223.- Rotavirus bovino cepa “B223”.

cDNA.- Hebra de DNA complementaria (siglas de “complementary deoxy ribonucleic acid”).

CoA.- Concanavalina A.

DEAE-sefarosa.- Dietil-aminoetil-sefarosa.

DLPs.- Partículas de doble capa (siglas “double layered particle”).

DNA.- Ácido desoxirribonucleico (siglas “deoxy ribonucleic acid”).

DS-1.- Rotavirus humano cepa “DS-1”.

dsRNA.- Ácido ribonucleico de doble hebra (siglas de “double strand ribonucleic acid”).

ECoA.- Fracción de elución de la cromatografía con Concanavalina A-sefarosa.

E-DEAE.- Fracción de elución total de la cromatografía con DEAE-sefarosa.ER.- Retículo endoplásmico.

ELISA.- Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (siglas de “Enzyme-linked immunosorbent assay”).

GFP.- Proteína fluorescente verde

Glc.- Glucosa

GV.- Granulovirus.

IC-BEVS.- Sistema de expresión baculovirus-células de insecto (siglas de “insect cells-baculovirus expression vector sistem”).

IPTG.- Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido.

KU.- Rotavirus humano cepa “KU”.

Man.- Manosa

NA.- Enzima neuraminidasa.

NAc.- N-acetilglucosamina

NSP1-6.- Proteína no estructural de rotavirus número 1-6.

ABREVIATURAS (continuación...)

NVP.- Nucleopoliedrovirus.

ORF.- Marco de lectura abierto (siglas de “Open Reading Frame”).

pb.- Pares de bases.

PCR.- Reacción en cadena de la DNA-polimerasa.

RER.- Retículo endoplásmico rugoso.

RNA.- Ácido ribonucleico (siglas de “ribonucleic acid”).

RRV.- Rotavirus de simio cepa “Rhesus”.

RT-PCR.- Reacción de transcripción reversa seguida por reacción en cadena de la DNA polimerasa.

SA.- Ácido siálico, ácido N-acetilneuramínico.

SA11.- Rotavirus de simio cepa “SA11”.

SA11-4F.- Rotavirus de simio “SA11-4F”.

Sf9 y Sf21.- Línea celular derivada de tejido ovárico del insecto *Spodoptera frugiperda*.

SLPs.- Partículas de capa simple (siglas “single layered particle”).

SN.- Sobrenadante.

ssRNA.- Ácido ribonucleico de hebra sencilla (siglas de “single strand ribonucleic acid”).

SV40.- Virus de simio “SV40”.

TLPs.- Partículas de triple capa (siglas “triple layered particle”).

Uff.- Unidades formadoras de focos infecciosos.

UK.- Rotavirus bovino cepa “United Kingdom”

VP1-8.- Proteína estructural de rotavirus número 1-8.

VP4r RRV.- Proteína recombinante VP4 de RRV.

VP7r RRV.- Proteína recombinante VP7 de RRV.

Wa.- Rotavirus humano cepa “Wa”.

WB.- Western Blot.

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1.- Electroforesis en gel mostrando el genoma de rotavirus y sus proteínas codificadas.	14
Figura 2.- Características generales de los genes de rotavirus.	16
Figura 3.- Estructura del rotavirus.	17
Figura 4.- Esquema de la proteína VP4 y sus dominios característicos.	19
Figura 5.- Esquema de la proteína VP7 y sus dominios característicos.	23
Figura 6.- Modelo de las interacciones tempranas entre rotavirus y la célula huésped.	24
Figura 7.- Esquema del sistema Bac to Bac [®] de Invitrogen [™] .	34
Figura 8.- Esquema del vector pFastBac1.	41
Figura 9.- Esquema del plásmido pGEM-3Z-VP4RRV-3.2.1.	42
Figura 10.- Esquema del plásmido pGEM-3Z-VP7RRV.	43
Figura 11.- Productos de PCR de bácmidos VP4 RRV.	51
Figura 12.- Pruebas confirmatorias de clonación del gen 9 RRV.	52
Figura 13.- Ensayo de western blot para detectar VP4 RRV recombinante.	53
Figura 14.- Ensayo de western blot para detectar VP7r RRV.	54
Figura 15.- Purificación de VP7.	56
Figura 16.- Purificación parcial de VP4.	57
Figura 17.- Cuantificación de VP4r RRV en E-DEAE.	58
Figura 18.- WB de las muestras derivadas de las reacciones de reconstitución bajo las condiciones “RRV 1” y “UK”.	62
Figura 19.- WB de las muestras derivadas de las reacciones de reconstitución bajo las condiciones “RRV 2” y “UK”.	63
Figura 20.- Infectividad de las mezclas de reconstitución.	65

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1.- Resumen de las proteínas codificadas por el genoma del rotavirus.	15
Tabla 2.- Características relevantes de los IC-BEVS.	32
Tabla 3.- Anticuerpos utilizados en ensayos de microscopía de inmunofluorescencia.	44
Tabla 4.- Anticuerpos utilizados en ensayos de Western Blot.	46
Tabla 5.- Resumen de los principales componentes de las mezclas de reconstitución.	60

I. RESUMEN

Se estima que cada año los rotavirus causan alrededor de 111 millones de episodios de gastroenteritis aguda, 2 millones de hospitalizaciones y cerca de 600,000 muertes en infantes menores de 5 años de edad en todo el mundo (Parashar et al., 2003 y 2006).

Los rotavirus son miembros de la familia “*Reoviridae*” y del género “*Rotavirus*”. Sus viriones carecen de envoltura lipídica y están conformados por tres capas concéntricas de proteínas que encierran a su genoma, este último constituido de 11 segmentos de RNA de doble cadena. El genoma de rotavirus codifica para seis proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (Estes & Kapikian, 2007).

La capa proteica interna del virión, está formada por 120 moléculas de la proteína VP2 que encierra al genoma viral, 12 copias de VP1 (una RNA polimerasa dependiente de RNA) y 12 copias de VP3 (una guanilil transferasa y metilasa). A las partículas compuestas de la capa proteica interna junto con el genoma viral se les conoce como partículas de capa simple (“SLPs”, por las siglas derivadas de “single-layered particles”) ó como “cores”. La capa proteica intermedia, está formada por 260 trímeros de VP6 y se ensambla justo por encima de la capa de VP2, generando así partículas de doble capa (“DLPs”, por las siglas provenientes de “double-layered particles”).

La capa proteica externa está compuesta por las proteínas VP4 y VP7. 780 copias de VP7 se organizan en trímeros y se ensamblan sobre las DLPs, formando una superficie lisa. VP4 se ensambla en dímeros y forma 60 estructuras en forma de espículas, que se proyectan a 12 nm de la superficie de VP7. Las DLPs cubiertas con la capa externa compuesta de VP4 y VP7 son conocidas como partículas de triple capa (TLPs, por las siglas provenientes de “triple-layered particles”), y ésta es la estructura que presentan las partículas virales maduras de los rotavirus (López & Arias, 2006).

Debido a que las proteínas de capa externa VP4 y VP7 están involucradas en las interacciones iniciales del virus con la célula huésped, son un amplio objeto de estudio e investigación para descubrir los mecanismos de entrada de este virus, así como para la generación de vacunas (López & Arias, 2006).

Dado que el desarrollo de sistemas de genética reversa eficientes y sencillos para estudiar las bases moleculares de la patogénesis de los virus miembros de la familia *Reoviridae* ha sido lenta (Boyce & Roy, 2007; Komoto et al. 2008), el desarrollo de

metodologías eficientes para incorporar VP4 y VP7 en DLPs, generaría herramientas muy útiles para investigar los mecanismos de entrada del rotavirus a la célula huésped. Tal sería el caso de reconstituir TLPs que contengan modificaciones en las proteínas VP4 y VP7 mediante mutagénesis dirigida de los genes que codifican para éstas, para poder estudiar los dominios involucrados en la entrada del virus a la célula huésped.

Durante la realización del presente proyecto de tesis se logró reconstituir TLPs de los rotavirus cepa RRV y UK a partir de sus DLPs y de las proteínas de capa externa VP4 y VP7 expresadas en células de insecto, usando baculovirus como vector de expresión. El presente trabajo generó dos puntos importantes:

- 1) El primer antecedente de que es posible obtener partículas infecciosas de la cepa de rotavirus UK a partir de sus DLPs y de las proteínas recombinantes VP4 y VP7 de la cepa de rotavirus RRV.
- 2) Un sistema prometedor para poder estudiar los diferentes mecanismos de entrada que presentan las cepas de rotavirus RRV y UK (Gutiérrez-Mayret et al., 2009).

II. INTRODUCCIÓN

II.1. ROTAVIRUS

II.1.1. GENERALIDADES

Los rotavirus son miembros de la familia “*Reoviridae*”, del género “*Rotavirus*”, y fueron descubiertos por Bishop y colaboradores en 1973 (Estes & Kapikian, 2007).

Se estima que cada año los rotavirus causan alrededor de 111 millones de episodios de gastroenteritis aguda, 25 millones de consultas clínicas, alrededor de 2 millones de hospitalizaciones, y de 454,000 a 705,000 muertes en infantes menores de 5 años de edad en todo el mundo (Parashar et al., 2003 y 2006).

La ruta de transmisión de este virus es la vía fecal-oral y aún existe debate sobre si también es transmitido por vía respiratoria. Los síntomas que se presentan durante la infección por rotavirus son principalmente vómito, diarrea y fiebre. El vómito dura en promedio 2.6 días y la diarrea hasta 9 días, siendo esta última la causa de deshidratación que puede llevar al paciente a la muerte. Ya que los síntomas y signos observados durante la infección por rotavirus son similares a los presentados por infecciones con otros patógenos, un diagnóstico correcto y certero requiere de la detección del virus, de antígenos virales o de una respuesta serológica del paciente. Para lo anterior se emplean principalmente técnicas como ELISA y electroforesis del genoma viral, aunque ensayos de RT-PCR son cada vez más comunes con lo que se logra un diagnóstico más sensible (Estes & Kapikian, 2007).

Los rotavirus infectan preferentemente a los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado.

Sin embargo, recientemente se ha descrito que en estudios *in vitro*, los rotavirus se unen a una gran variedad de líneas celulares, tales como células de origen renal e intestinal y células transformadas derivadas de pulmón, hígado, huesos y estómago aunque no infectan a todas ellas, sugiriendo que la unión de estos virus a diferentes células es promiscua y que la interacción con los receptores celulares responsables de la entrada viral en células permisivas ocurre probablemente en pasos posteriores a dicha unión (López & Arias, 2004).

Las partículas virales son estables cuando se mantienen a 4°C, funcionales en un intervalo de pH de 3.0 a 9.0 y su infectividad se inactiva al someterlas a temperaturas mayores de 50 °C durante un mínimo de 15 minutos (Estes et al., 1979).

II.1.2. GENOMA

El genoma de los rotavirus está constituido de 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA por las siglas provenientes del inglés “double stranded RNA”). Estos segmentos de dsRNA varían en su tamaño desde 667 hasta 3302 pares de bases (pb), lo que permite obtener un patrón electroforético característico del genoma viral. El tamaño promedio del genoma total de los rotavirus es de 18,556 pb. Cada segmento del genoma del rotavirus codifica para una proteína, con excepción del fragmento 11, que codifica para dos proteínas (Fig. 1), dando como resultado la expresión total de doce proteínas (Tabla 1). Seis de las proteínas son no-estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6), y seis son estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7), las cuales conforman al virión (Jiang et al. 2008).

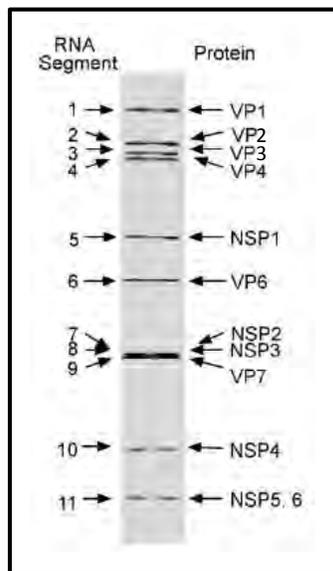


Figura 1. Electroforesis en gel mostrando el genoma de rotavirus. En la parte izquierda de la figura se muestran los segmentos de dsRNA que conforman el genoma del rotavirus. A la derecha se muestran las proteínas codificadas por cada gen. Tomada de Jayaram et al. (2004).

Tabla 1. Resumen de las proteínas codificadas por el genoma del rotavirus^a.

PROTEÍNAS ESTRUCTURALES				
Proteína	Segmento que la codifica	Peso molecular (kDa)^b	Localización en el virión	Funciones y propiedades
VP1	1	125	Capa interna	Actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA, una ssRNA, forma complejo con VP3, interactúa con NSP5.
VP2	2	103	Capa interna	Una RNA; es requerida para la actividad de replicasa de VP1, es un dímero, interactúa con NSP5.
VP3	3	98	Capa interna	Actividad de guanilil transferasa, metiltransferasa, una ssRNA, forma complejo con VP1.
VP4 (VP5*/ VP8*)	4	88 (60/ 28)	Capa externa	Actividad de hemaglutinina, posee antígenos neutralizantes, sensible a proteasas, incremento de la infectividad por proteasas, virulencia, interacción y anclaje con receptores celulares, forma las espículas virales.
VP6	6	45	Capa intermedia	Ensamblaje en trímeros, contiene los antígenos responsables de la clasificación del virus en grupos y subgrupos.
VP7	9	37	Capa externa	Glicoproteína integral de la membrana de RER, se ensambla en trímeros, tiene antígenos neutralizantes, un calcio, tiene dos regiones hidrófobas en el extremo N-terminal.
PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES				
Proteína	Segmento que la codifica	Peso molecular (kDa)*	Localización celular	Funciones y propiedades
NSP1	5	58	Citoplasma	Ligeramente básica, tiene dos motivos de dedos de zinc ricos en cisteína, una RNA, interactúa con IRF3 e induce su degradación.
NSP2	8	37	Viroplasma	Es básica, forma octámeros, una ssRNA de manera no específica, actividad de NTPasa, se une a NSP5 y VP1, involucrada en la formación de viroplasma, regula fosforilación de NSP5.
NSP3	7	35	Citoplasma	Ligeramente ácida, forma homodímero, se une específicamente a extremo 3' del mRNA de rotavirus, interactúa con eIF4GI.
NSP4	10	20	Reticulo endoplásmico (RE)	Glicoproteína transmembranal del RE, enterotoxina, es receptor para la gemación de DLPs a través de la membrana del RE, regula la síntesis de RNA, multifuncional.
NSP5	11	22	Viroplasma	Ligeramente básica, glicosilada, rica en serina y treonina, fosfoproteína, interactúa con NSP2 para formar viroplasma, interactúa con VP1, VP2 y NSP6.
NSP6	11	11	Viroplasma	Producto del segundo ORF, interactúa con NSP5.

^aModificada de Jiang et al., (2008). RE= Reticulo endoplásmico.

^bPredicción del peso molecular de las proteínas del rotavirus SA11.

Las secuencias de los genes de diferentes cepas de rotavirus comparten características generales en su estructura (Fig. 2). Cada segmento de RNA de polaridad positiva contiene una estructura de tipo “cap” en el extremo 5’, seguido de una serie de secuencias conservadas que forman parte de una región no codificante en el mismo extremo. Después de esta región, le siguen un marco de lectura abierto y una región no codificante en el extremo 3’, que no posee señales de poliadenilación y que contiene secuencias importantes para la expresión de genes y la replicación del genoma (Estes & Kapikian, 2007).

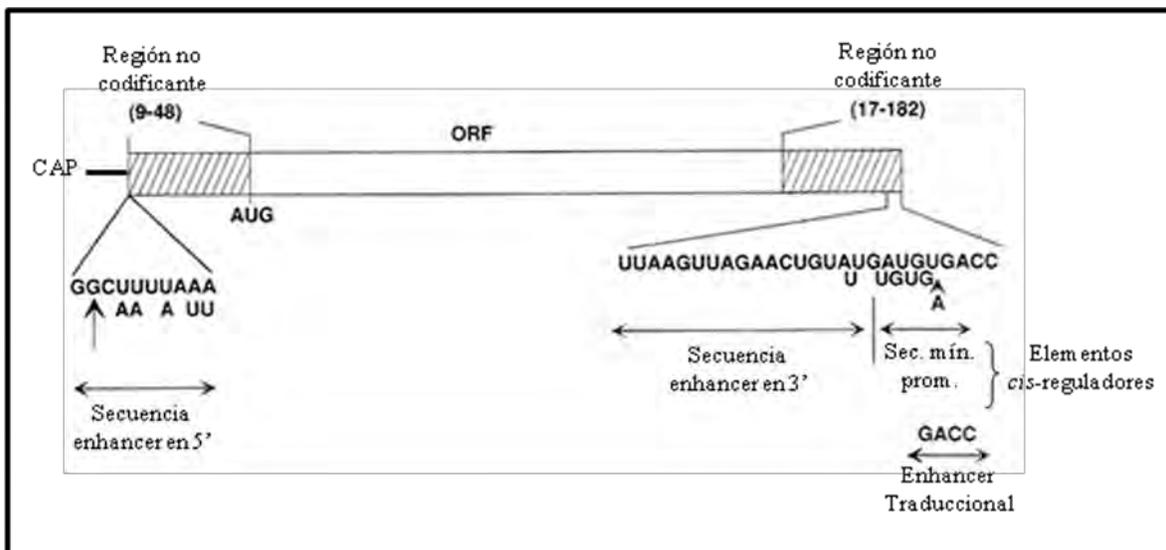


Figura 2. Características generales de los genes de rotavirus. Se muestran las secuencias conservadas entre los segmentos de RNA de polaridad positiva encontradas en diferentes cepas de rotavirus. Entre éstas se encuentran secuencias de tipo “enhancer” de la transcripción en los extremos 5’ y 3’ no codificantes. También se encuentra una secuencia de tipo enhancer traduccional dentro de la región 3’ no codificante. Imagen modificada de Estes & Kapikian (2007).

II.1.3. CARACTERÍSTICAS DE LA PARTÍCULA VIRAL

Las partículas virales maduras de rotavirus poseen una simetría icosaédrica, miden aproximadamente 70 nm de diámetro, carecen de envoltura lipídica y están conformadas por tres capas concéntricas de proteínas (Fig. 3), que contienen al genoma viral. Por criomicroscopía electrónica se ha observado que los rotavirus tienen 132 canales acuosos los cuales han sido clasificados en tres grupos (I, II y III) con base en su localización respecto a los ejes simétricos del icosaedro (Estes & Kapikian 2007).

La capa protéica interna de los rotavirus mide cerca de 30 Å de espesor y se encuentra formada por 120 moléculas de la proteína VP2 asociada en dímeros. En la superficie interna de esta capa, se encuentran ancladas 12 copias de VP1 que posee actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA, y 12 copias de la guanilil transferasa y metilasa VP3, asociadas a los canales tipo I que se localizan en los ejes icosaédricos con simetría de 5.

La capa protéica intermedia está formada por 780 copias de VP6 ordenadas en 260 trímeros. Esta capa se ensambla justo por encima de la capa interna compuesta por VP2, generando así, partículas de doble capa (DLPs, por sus siglas en inglés).

VP6 es la proteína más abundante (en masa) de la estructura del rotavirus. Estudios de criomicroscopía electrónica de DLPs y TLPs, han determinado que VP6 interactúa con VP2, VP7 y VP4 y que, los aminoácidos implicados en estas interacciones se encuentran altamente conservados (Jiang et al., 2008).

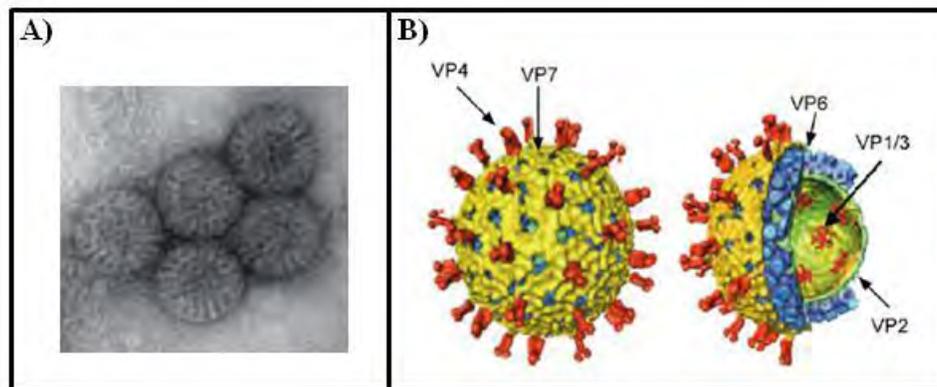


Figura 3. Estructura del rotavirus. A) Fotografía de TLPs de rotavirus observadas por microscopía electrónica. Tomada de Trask y Dormitzer (2006). B) Esquema de la partícula de rotavirus obtenida por reconstrucción de imágenes generadas por criomicroscopía electrónica. Se muestran las proteínas estructurales de rotavirus. Tomada de Jayaram et al. (2004).

La capa proteínica externa está compuesta por las proteínas VP4 y VP7. 780 copias de VP7 se organizan en 260 trímeros y se ensamblan sobre las DLPs, formando una superficie lisa. 120 copias de VP4 se ensamblan en dímeros que dan lugar a las 60 espículas virales que se proyectan a 12 nm de la superficie de VP7. Las DLPs cubiertas por la capa externa compuesta de VP4 y VP7 son conocidas como partículas de triple capa (TLPs, por

sus siglas en inglés), y éste es el tipo de estructura que presentan las partículas virales maduras de los rotavirus (López & Arias, 2006).

II.1.4. CLASIFICACIÓN

Los rotavirus se clasifican serológicamente en múltiples grupos y diferentes subgrupos con base en determinantes antigénicos en VP6 (esta proteína también contiene los epítopes de grupo). Existen siete distintos grupos (A-G), de los cuales el grupo “A” es el de mayor importancia clínica en humanos. Los rotavirus del grupo “A”, se clasifican en serotipos con base en la neutralización con anticuerpos dirigidos contra las proteínas de superficie del virus. Los anticuerpos contra VP4 definen los serotipos “**P**”, “proteína sensible a **P**roteasa” y los dirigidos contra VP7 definen los serotipos “**G**”, por “**G**licoproteína” (Estes & Kapikian, 2007).

II.1.5. LA PROTEÍNA VP4

Los dímeros de la proteína estructural VP4 dan origen a las espículas virales. La proteína VP4 de una de las cepas más estudiadas de rotavirus, la cepa RRV, está formada por 776 aminoácidos (aa) y tiene un peso molecular de 88 kilodaltones (kDa). Esta proteína es codificada por el segmento cuatro del genoma viral y es clave en las interacciones tempranas del rotavirus con su célula huésped.

La penetración de los rotavirus a la célula es activada por el tratamiento del virus con tripsina (Arias et al., 1996). Se ha demostrado que esta proteasa actúa sobre VP4, lo cual produce tres cortes muy cercanos en la proteína (aa R231, R241 y R247), generando dos productos principales de la hidrólisis. Uno de éstos es el polipéptido VP8* de 231 aa, con un peso molecular de 28 kDa y localizado hacia el extremo amino terminal de VP4. El otro producto es el polipéptido VP5*, formado por 528 aa, con un peso molecular de 60 kDa y localizado hacia el extremo carboxilo terminal de VP4 (López & Arias, 2006).

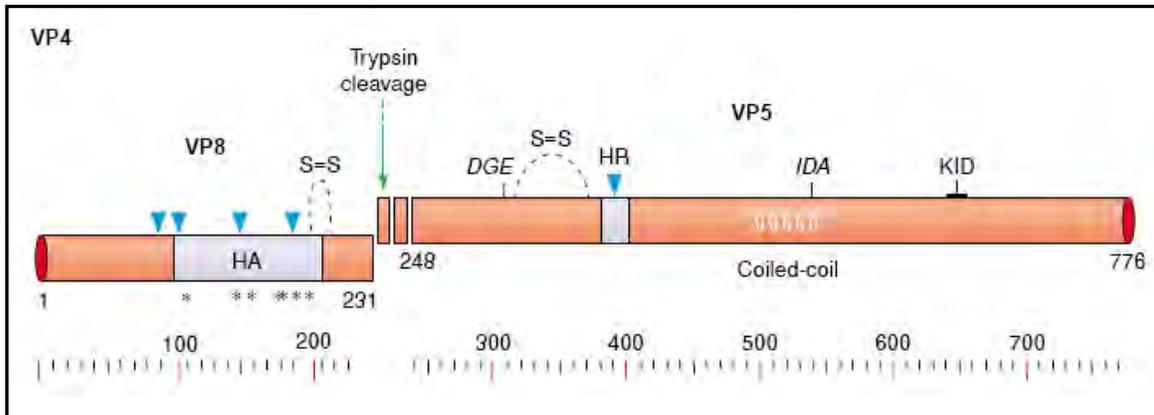


Figura 4. Esquema de la proteína VP4 y sus dominios característicos. La escala está basada en los aa que conforman a la proteína. La descripción de los dominios de VP4 se encuentra en el texto. Modificada de López & Arias, (2004).

Se ha propuesto que la interacción inicial de algunas cepas de rotavirus con su célula huésped se lleva a cabo mediante receptores celulares que tienen moléculas terminales de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico, SA de sus siglas en inglés). El tratamiento de las células con neuraminidasa (NA), enzima que corta los residuos de SA terminales, disminuye la infectividad de algunas cepas de rotavirus. Ejemplos de este caso son las cepas de rotavirus de simio RRV y SA11 (sensibles a NA), mientras que en otros casos como el de las cepas de rotavirus bovino UK y rotavirus humano Wa, no se observa tal efecto, y por este motivo a este tipo de cepas se les ha denominado resistentes a NA (Isa et al., 2006).

Hace tiempo se demostró que VP8* presenta actividad de hemaglutinina (Fiore et al., 1991) y posterior a esto, Fuentes-Panana et al. (1995), utilizando proteínas VP4 quiméricas expresadas en el sistema de baculovirus y provenientes de cepas de rotavirus con y sin actividad de hemaglutinación, encontraron que el dominio de VP8* responsable de esta actividad se encuentra en la región comprendida entre los aa 93 y 208.

Poco después, Isa et al. (1997) encontraron que el aa Y155 y el tripéptido YYS en las posiciones 188 a 190, eran importantes para la unión de SA.

Lo anterior fue corroborado por Dormitzer et al. (2002) al publicar la estructura atómica de VP8* unida a SA. En ese trabajo, se reportó una representación superficial de la región de VP8*, comprendido entre los residuos de aa 65 y 224, y en donde el sitio de unión a SA parece ser un surco poco profundo. Las cadenas laterales de los aa Y188 y S190

forman el borde del surco, el anillo aromático del aa Y155 forma el borde opuesto, y las cadenas laterales de los aa R101, V144, K187 y Y189 forman la base o piso.

Por otra parte, el fragmento VP5* contiene varias regiones que son importantes para las interacciones del virus con la célula huésped. Un ejemplo de éstas es la región hidrófoba existente entre los aa 385 y 404, que se ha demostrado está involucrada en la permeabilización de membranas modelo y celulares (Denisova et al. 1999 y Dowling et al. 2000), aunque aún se desconoce cuál es el mecanismo exacto por el que VP5* interactúa con las membranas celulares y afecta la permeabilidad celular.

Posteriormente, Golantsova et al. (2004) demostraron que se requiere de dos dominios para las interacciones de VP5* con la membrana de células eucariontes. Uno de ellos es un dominio comprendido entre los aa 265 y 279 que se asocia periféricamente con la membrana. El segundo, es el dominio hidrófobo mencionado anteriormente.

Se han identificado tres regiones antigénicas en VP5* denominados I, II y III (Taniguchi et al. 1988), y de las cuales, la región II se encuentra localizada dentro del dominio hidrófobo mencionado arriba.

Dentro del fragmento VP5* de la cepa de rotavirus RRV, existe un puente disulfuro entre los aminoácidos C318 y C380. En la cepa de rotavirus nar3, existe una cisteína adicional en la posición 267 que es capaz de formar un puente disulfuro con la C318. Cuadras et al. (1998) demostraron que la infectividad del rotavirus RRV así como de su variante nar3, se ve diferencialmente afectada por el tratamiento con agentes reductores, indicando que los puentes disulfuro en VP5* son importantes para la infectividad del virus.

También se han propuesto a diferentes secuencias de tripéptidos en VP5* como los responsables de interactuar con diferentes integrinas y con la proteína constitutiva de estrés calórico Hsc70. Ejemplo de esto es el tripéptido IDA, localizado en las posiciones 538 a 540, que se ha propuesto que interactúan con la integrina $\alpha 4\beta 1$ (Coulson et al. 1997). Otro tripéptido que Graham et al. (2005) han propuesto que está implicado en la unión a la misma integrina y también a la integrina $\alpha 4\beta 7$ es YGL.

Así mismo Zárate et al. (2000) propusieron que el tripéptido DGE (aa 308 a 310) de VP5* interacciona con la integrina $\alpha 2\beta 1$.

Posteriormente, el mismo grupo de investigación descubrió que la región comprendida entre los aa 642 y 658 de VP5* contiene la secuencia tripéptido KID, que interactúa con la proteína constitutiva de estrés calórico Hsc70 (Zárate et al., 2003).

II.1.6. LA PROTEÍNA VP7

La proteína estructural VP7 es codificada por el segmento nueve del genoma de la cepa de rotavirus RRV. Esta glicoproteína, de 326 aminoácidos y aproximadamente 38 kDa de peso molecular, se agrupa en trímeros para formar una capa uniforme sobre las DLPs. Su ensamblaje es dependiente de calcio (López & Arias, 2006). Recientemente se reportó su estructura cristalográfica demostrando que una molécula de esta proteína estructural de rotavirus une dos iones de este metal. También fueron identificados a los aminoácidos implicados en su unión con este ión (Aoki et al., 2009).

Se ha determinado que el tipo de glicosilación que presenta VP7 es de N-oligosacáridos de alta manosa y el número de sitios de glicosilación en esta proteína depende de la cepa de rotavirus. La cepa SA11 contiene un solo sitio de glicosilación en el aa 69 (Gunn et al., 1985), al igual que la cepa de rotavirus de simio RRV (Mackow et al., 1988). La cepa de rotavirus humano Wa, presenta dos sitios potenciales de glicosilación, uno en la posición del aa. 69 y otro en aa. 238 (Gunn et al., 1985), aunque se desconoce cuál(es) de estos sitios está(n) glicosilados.

Durante las reacciones de N-glicosilación se transfiere un grupo de glicanos precursor, constituido por dos residuos de N-Acetil glucosamina (NAc), nueve residuos de manosa (Man) y tres residuos de glucosa (Glc), a un residuo de asparagina de la cadena polipeptídica naciente. Posterior a esto, y dentro del mismo retículo endoplásmico (ER), enzimas como la glucosidasa I y II y la manosidasa del ER remueven residuos del oligosacárido precursor, generando una gama de perfiles de glicosilación en alta manosa (Wildt & Gerngross, 2005).

El perfil de glicosilación de la proteína VP7 ya ensamblada en TLPs purificadas del rotavirus de simio SA11 fue estudiado por Kabnecell & Atkinson (1985). En ese estudio se encontró que la proteína VP7 presente en células MA104, provenientes de células embrionarias de riñón de mono verde africano (*Cholorocebus aethiops*), infectadas con rotavirus de simio SA11, existen dos poblaciones de moléculas de VP7 que difieren en la

localización dentro del lumen del ER y en el perfil de glicosilación. Una de estas poblaciones se encuentra asociada a la cara interna de la membrana del retículo endoplásmico y contiene glicosilaciones de tipo GlcMan₈NAC₂, GlcMan₆NAC₂ y GlcMan₉NAC₂ principalmente, aunque también se detectaron los tipos GlcMan₇NAC₂ y GlcMan₅NAC₂. Este tipo de patrón de glicosilación es el mismo que se observó al analizar la proteína VP7 intracelular total, sin importar su localización exacta dentro del ER.

La otra población de VP7, es la que se encuentra asociada al virión y presenta los tipos de glicosilación GlcMan₆NAC₂ y GlcMan₅NAC₂. Todo esto sugiere que la mayoría de la proteína VP7 se encuentra asociada a la membrana de este organelo y que el procesamiento de la cadena de oligosacáridos podría ocurrir sobre la VP7 ya ensamblada en el virión mientras éste permanece en el lumen del ER (Kabnecell & Atkinson, 1985).

Lo anterior fue confirmado posteriormente con el uso de dos tipos de anticuerpos. Para detectar la proteína VP7 en la membrana del ER (VP7 sin ensamblarse) se usaron anticuerpos policlonales contra la proteína desnaturalizada, mientras que para detectar el otro tipo de VP7, la que se encuentra ensamblada en el virión, se usó un anticuerpo monoclonal (Kabcenell et al., 1988; Maruri-Avidal et al., 2008).

La secuencia de nucleótidos del gen para VP7 predice un marco abierto de lectura de 326 aminoácidos que inicia con una secuencia consenso de Kozak débil (Kozak, 1981), sin embargo, 30 nucleótidos después en sentido de 5' a 3' se encuentra un segundo codón de inicio en fase, con una secuencia de inicio fuerte. Ambos codones de inicio preceden regiones hidrofóbas denominadas H1 y H2 (Fig. 5), que tienen el potencial de funcionar como péptidos señal para dirigir la síntesis de VP7 hacia el ER (Poruchynsky et al., 1985). También se ha encontrado en algunas cepas de rotavirus, un tercer codón de inicio en fase, localizado después del segundo dominio hidrófobo (Arias et al., 1984).

Stirzaker et al. (1989) demostraron que el péptido señal de VP7 es cortado por la acción de la enzima señalasa entre A50 y Q51, por lo que el extremo amino terminal de la proteína VP7 madura es este último aminoácido.

A pesar de que la proteína VP7 no contiene la secuencia típica de retención en el ER (KDEL), permanece en este organelo. Se han encontrado dos secuencias de aa muy conservadas que podrían servir para este fin. Una de ellas es la secuencia ITG en las posiciones 9 a 11 de la proteína madura (Maass et al., 1994). La otra secuencia es

MSKRSRS, localizada en el extremo carboxilo terminal, los residuos de aminoácidos 292 a 311 (Clarke et al. 1995).

En el proceso de maduración de VP7, aparte de la glicosilación, también ocurre la formación de puentes disulfuro intramoleculares (Svensson et al. 1994), y recientemente fueron identificados en las posiciones C82-C135, C165-C249, C191-C244 y C196-C207 (Aoki et al., 2009).

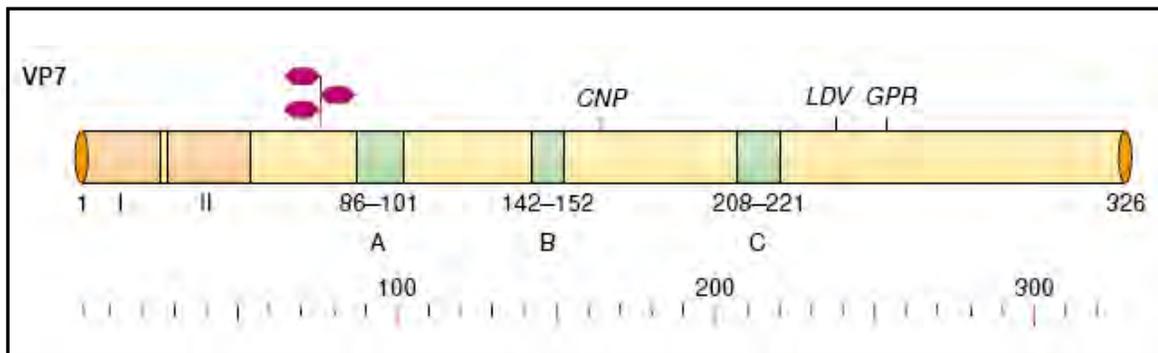


Figura 5. Esquema de la proteína VP7 y sus dominios característicos. La escala está basada en los aa que conforman a la proteína. La descripción de los dominios de VP7 se encuentra en el texto. Modificada de López & Arias (2004).

La proteína VP7 interacciona directamente con moléculas de la superficie de la célula huésped en un paso subsecuente al anclaje inicial del virus que ocurre a través de VP4 (López & Arias, 2006). Esta proteína estructural contiene varios motivos de secuencias de unión a integrinas.

Se ha propuesto que el tripéptido LDV en la posición de aa 237 a 239 interacciona con la integrina $\alpha 4\beta 1$, mientras que el motivo GPR en las posiciones 253 a 255, interactúa con la integrina $\alpha X\beta 2$. Existe fuerte evidencia de que en VP7 hay un dominio de unión para la integrina $\alpha V\beta 3$ al cuál le han llamado dominio CNP y se localiza en los residuos de aa 161 a 169. Otras regiones importantes de VP7 son tres dominios antigénicos nombrados A, B y C, y que han sido mapeados y localizados en las posiciones de aa 86 a 101, 142 a 152 y 208 a 221, respectivamente (López & Arias, 2004 y 2006).

II.1.7. ADSORCIÓN Y ENTRADA

Las primeras etapas de una infección viral consisten en el anclaje de las partículas virales a receptores celulares y seguido por la internalización del virus al interior de la célula, donde se lleva a cabo la replicación del genoma y la expresión de sus proteínas que darán origen a la progenie viral.

Para el caso de rotavirus, López y Arias (2004) propusieron un modelo sobre las interacciones tempranas del rotavirus con su célula huésped (Fig.6).

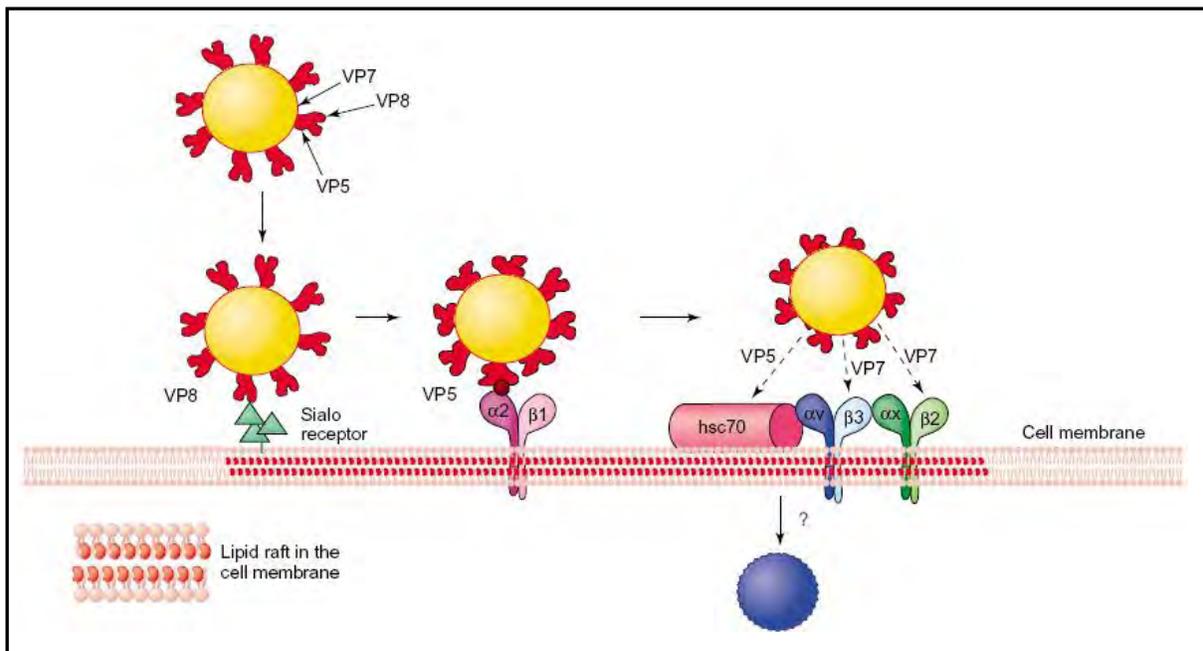


Figura 6. Modelo de las interacciones tempranas entre rotavirus y la célula huésped. Se muestran las proteínas estructurales de rotavirus y los diferentes receptores propuestos para dichas interacciones. “Sialo receptor” = receptores conteniendo ácidos siálicos, “ $\alpha2\beta1$, $\alpha\nu\beta3$ y $\alpha x\beta2$ ” = diferentes integrinas y “hsc70” = proteína constitutiva de estrés calórico. Imagen tomada de López & Arias, (2004).

Los autores proponen que la interacción del rotavirus con su célula huésped se da por un proceso de pasos múltiples y secuenciales, dentro de los cuales es muy probable que la interacción inicial se lleve a cabo entre el dominio VP8* de VP4 y un receptor celular conteniendo SA (muy probablemente como parte de un gangliósido). La interacción inicial del virus con el receptor que contiene el SA, probablemente induce un cambio conformacional en VP4, lo que permite la interacción subsecuente del dominio DGE en VP5* con el dominio I de la integrina $\alpha2\beta1$. Posterior a esta segunda interacción, ocurren

tres más. Se cree que las primeras interacciones del virus con su célula huésped podrían promover cambios conformacionales en VP4 que facilitarían la interacción entre el dominio KID de VP5* y el dominio de unión a ligando de la proteína hsc70, otra interacción entre la región CNP de VP7 y la integrina $\alpha\beta3$, y una interacción que se da entre el dominio GRP de VP7 y la integrina $\alpha\beta2$, aunque se desconoce cuál es el orden en el que se llevan a cabo estas últimas interacciones y si todas son necesarias para que el virus infecte.

Los datos generados en nuestro laboratorio indican que la entrada del rotavirus a la célula huésped se lleva a cabo por endocitosis mediada por receptor. También se sabe de manera concreta que la entrada de la cepa de rotavirus de simio RRV a su célula huésped es dependiente de flotilina (Gutiérrez-Mayret et al., 2009), dependiente de dinamina, independiente de clatrina y caveolina, y sensible a la ausencia de colesterol en la membrana celular (Guerrero et al., 2000; Sánchez –San Martín et al., 2004); mientras que la entrada de la cepa de rotavirus bovina UK es dependiente de clatrina y de dinamina, independiente de flotilina y caveolina y al igual que para la cepa RRV, también es sensible a la ausencia de colesterol en la membrana celular (Gutiérrez-Mayret et al., 2009).

Lo anterior sugiere que los rotavirus, al menos las cepas RRV (NA-sensible) y UK (NA-resistente), presentan diferentes mecanismos de endocitosis asociados a su entrada en la célula huésped.

El mecanismo mediante el cual el rotavirus se internaliza en la célula aún se desconoce; sin embargo, se proponen dos principales rutas (Isa et al., 2008):

1) Una ruta de internalización basada en la penetración directa de la membrana por el rotavirus y la liberación de la DLP en el citoplasma, y,

2) Una ruta de internalización llevada a cabo mediante endocitosis dependiente de dinamina. Así pues, la TLP quedaría dentro de una vesícula endocítica en donde podría liberarse hacia el citoplasma mediante dos propuestas alternativas:

Una propuesta es que, la liberación de la DLP al citoplasma ocurre cuando una bomba de protones (ATPasa) saca el calcio de la vesícula endocítica donde se encuentra el virus. La disminución en la concentración de este ion pudiera provocar el desprendimiento de las proteínas de capa externa del virus y posteriormente la permeabilización de la membrana endosomal.

La otra propuesta es que, dentro de la vesícula endosomal, VP8* podría disociarse de la partícula viral y exponer el dominio hidrófobo de VP5*. Éste, al interactuar con la membrana endosomal, crearía un poro que le permitiría a la partícula salir hacia el citoplasma.

Aún falta demostrar experimentalmente estas propuestas de internalización del rotavirus en la célula huésped.

II.2. GENÉTICA REVERSA

En el área de la virología los estudios basados en el enfoque de genética reversa permiten poner a prueba hipótesis racionales y responder preguntas complejas acerca de la estructura de los viriones y de las interacciones virus-célula hospedera. La genética reversa puede proveer las herramientas necesarias para 1) diseñar vacunas con virus recombinantes, 2) desarrollar vectores virales de expresión heteróloga para terapia génica y 3) estudiar la función de los genes en la replicación y patogénesis de estos microorganismos (Deming et al. 2006; Horimoto & Kawoaka 2006). Lo anterior se logra con la introducción de mutaciones puntuales dentro de los genomas virales para analizar los productos codificados, así como las secuencias no codificantes del mismo.

En la actualidad existen sistemas de genética reversa para la mayoría de las familias de virus de RNA que infectan mamíferos. Los trabajos pioneros en donde está presente el enfoque de la genética reversa con virus de RNA fueron hechos con virus cuyos genomas son de RNA de polaridad positiva. Ejemplo de estos trabajos son los generados por Taniguchi et al. (1978) con el bacteriófago Q β , y por Racaniello y Baltimore (1981) con poliovirus, en donde fueron recuperados virus infecciosos a partir de plásmidos de DNA.

Posteriormente también fueron desarrollados trabajos de genética reversa para virus con genomas de RNA de polaridad negativa. Tal es el caso de Radecke et al. (1995) con la recuperación de virus del sarampión a partir de clonas de DNA complementario (cDNA). También existen trabajos basados en este enfoque con el virus de la influenza A (Neumann & Kawoaka, 1999; Fodor et al., 1999), con bunyavirus (Bridgen & Elliott, 1996), y con varias de especies de las familias *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Filoviridae* y *Orthomyxoviridae* (Neumann et al., 2002).

Para el caso del rotavirus, el desarrollo de un sistema de genética reversa eficiente para estudiar las bases moleculares de su patogénesis aún no se ha logrado (Komoto et al. 2008). A la fecha se han reportado varios intentos por desarrollar este tipo de sistemas con virus pertenecientes a la familia *Reoviridae*, los cuáles se describen a continuación.

II.2.1. GÉNERO *Orthoreovirus*

El primer sistema de genética reversa de un miembro de la familia *Reoviridae* fue desarrollado por Roner y Joklik (2001). Estos autores, basados en los hechos de que:

1) Los transcritos *in vitro* de un *Orthoreovirus*, el reovirus serotipo 3 (ST3), son infecciosos, es decir, producen una progenie viral infecciosa. Lo anterior sucede cuando se lipofectan a una línea celular permisiva, en este caso la línea celular L292 (células “L”, provenientes de fibroblastos de ratón), junto con un reovirus auxiliar (ST1 ó ST2), y empleando un método de selección para las clonas de reovirus ST3, como lo puede ser el uso de sueros policlonales (Roner et al., 1990); 2) Usando el sistema anterior pudieron construir una doble mutante sensible a temperatura del reovirus ST3 (Roner et al., 1997).

Este sistema tiene muchos requerimientos, tales como:

- 1) La construcción de un templado de cDNA conteniendo el promotor de la T7-RNA polimerasa, y parte del extremo 5' de la secuencia del segmento que se desea incorporar.
- 2) Nueve mRNAs, cada uno correspondiente a su segmento de dsRNA del genoma del reovirus ST3.
- 3) Una línea celular transformada que expresa establemente el gen del virus ST3 que se desee expresar.
- 4) Un reovirus auxiliar.
- 5) Un método confiable de tamizaje para elegir clonas del ST3 mutante (ya sea por anticuerpos ó mediante mutantes sensibles a temperaturas).

A pesar de lo complejo de esta metodología sólo el 50% de todas las clonas generadas con este sistema correspondió al reovirus mutante.

Kobayashi et al. (2007) generaron un sistema de genética reversa para reovirus al parecer “más sencillo” que el reportado por Roner y Joklik (2001) basado en la transfección de plásmidos a células “L”. Cada plásmido contiene un cDNA correspondiente a uno de los diez diferentes segmentos de dsRNA que conforman el genoma del reovirus, bajo el control

del promotor de la RNA polimerasa del fago T7. Por este motivo, antes de transfectar los plásmidos, fue necesario infectar con una cepa recombinante y atenuada del virus vaccinia que proporcionó la RNA polimerasa T7. Con este sistema, los autores construyeron y recuperaron virus mutantes viables conteniendo mutaciones puntuales introducidas en las proteínas de cápside $\sigma 1$ y $\sigma 3$, además de construir un virus recombinante que expresó a la proteína verde fluorescente (GFP) mediante el reemplazo del marco abierto de lectura de $\sigma 3$ por la secuencia de dicha proteína.

Con este trabajo se comprobó que es posible obtener un sistema de genética reversa, al menos para reovirus, utilizando el producto de la transcripción *in vivo* de los diez cDNAs presentes en plásmidos y usando un virus auxiliar diferente a reovirus.

II.2.2. GÉNERO *Orbivirus*

Recientemente, Boyce et al. (2008) publicaron un trabajo de genética reversa usando el “bluetongue virus” (BTV), un virus del género *Orbivirus*. Basados en el antecedente de que los transcritos (ssRNA) obtenidos *in vitro* a partir de “cores” de BTV tipo 1 (BTV-1), cuando se transfectaron en células permisivas (en este caso usaron las células BSR que son una clona de las células BHK-21, una línea celular proveniente de riñón de cría de hámster) producían altos niveles de proteínas virales y además se recuperaban virus infecciosos (Boyce & Roy, 2007). Estos investigadores lograron obtener virus infecciosos mediante la transfección de los transcritos derivados de “cores” del BTV-1 y de algunos transcritos correspondientes a los segmentos de dsRNA de diferentes serotipos de BTV. Estos últimos se obtuvieron a partir del cDNA correspondiente a cada segmento del BTV, clonado en un plásmido bajo el promotor de la RNA polimerasa T7 y mediante transcripción *in vitro*. Los autores también obtuvieron virus infecciosos cuando transfectaron todos los transcritos correspondientes a los segmentos de dsRNA de BTV-1 provenientes de plásmidos.

II.2.3. GÉNERO *Rotavirus*

A la fecha existen un par de reportes sobre genética reversa en este género (Komoto et al., 2006; Komoto et al., 2008). En el trabajo de Komoto et al. (2006) demuestran que es

posible recuperar virus infecciosos utilizando un sistema que contiene los siguientes elementos:

- 1) Un plásmido construido con el gene 4 del rotavirus de simio SA11, flanqueado en su extremo 5' por el promotor de la T7 RNA polimerasa y en su extremo 3' la secuencia de la ribozima del virus delta de la hepatitis seguida por una secuencia terminadora de la transcripción.
- 2) Un virus recombinante vaccinia atenuado para que proporcionara la RNA polimerasa T7.
- 3) El rotavirus humano KU como auxiliar.
- 4) La línea celular MA104 en donde se llevó a cabo el rescate del virus mutante y la amplificación del título viral de las clonas del mismo.
- 5) Una batería de anticuerpos monoclonales empleados durante el rescate del mutante y que neutralizan de manera específica al rotavirus auxiliar KU.

Usando los elementos anteriormente enumerados estos investigadores reportan haber obtenido rotavirus humanos recombinantes que poseen el gen 4 del rotavirus de simio SA11. Aunque no mencionan cifras, los autores describen que la eficiencia en la recuperación de los virus recombinantes es baja. Otra limitante importante para alguien que quiera desarrollar un sistema de genética reversa similar es contar con todos los elementos y con la infraestructura necesaria para llevar a cabo la metodología usada.

Recientemente, Komoto et al. (2008), utilizando el sistema mencionado anteriormente lograron obtener un rotavirus KU recombinante. El epítipo neutralizante II, localizado en el dominio VP5* de la proteína VP4 de SA11 (aa. 381 a 401), fue reemplazado por el dominio II de la misma proteína pero de la cepa de rotavirus humana DS-1. De esta manera los autores lograron el rescate de un rotavirus KU recombinante que posee un mosaico antigénico de epítopos neutralizantes sobre la proteína VP4. Sin embargo, en este trabajo se detecta otra limitante más aparte de las expuestas arriba. En el trabajo previo publicado por estos autores (Komoto et al., 2006) se detecta que los títulos virales procedentes de países para la amplificación de títulos virales de la mutante, difieren significativamente de manera negativa cuando se comparan con los de la cepa de origen KU. En el trabajo recién publicado (Komoto et al. 2008) encuentran que el título viral de la nueva mutante que contiene epítopos de VP4 de SA11 y de DS-1 disminuye 10 veces

comparado con los títulos de la mutante sencilla (Komoto et al. 2006) que ya de antemano se había mostrado que eran bajos.

Los casos de genética reversa existentes hasta ahora para los miembros de la familia *Reoviridae* son buenos intentos por obtener sistemas viables que permitan ampliar los conocimientos sobre este tipo de virus. Sin embargo, aunque muestran diferentes estrategias, la mayoría no dejan de ser sistemas complicados desde el punto de vista metodológico y no arrojan resultados viables para poner a prueba de forma inmediata todas aquellas hipótesis sobre los virus de esta familia, claro, independientemente de si el investigador posee la infraestructura y los elementos necesarios para poder llevarla a cabo.

En conclusión, actualmente no se cuenta con un sistema de genética reversa para estudiar los procesos relacionados a la adsorción y entrada de los rotavirus a la célula hospedera.

III. ANTECEDENTES

III.1. SISTEMA BACULOVIRUS-CÉLULAS DE INSECTO

III.1.1. GENERALIDADES

El sistema de expresión de baculovirus-células de insecto (IC-BEVS, siglas provenientes de “insect cells-baculovirus expression vector system”) se ha usado desde hace 20 años y debido a las características que posee (Tabla 2) ha llegado a ser uno de los sistemas de expresión más usados para la producción de proteínas recombinantes (Kost et al., 2005; Palomares et al., 2005).

Los baculovirus se encuentran clasificados dentro de la familia *Baculoviridae*. Estos virus se encuentran clasificados en dos géneros: *Nucleopoliedrovirus* (NPV) y *Granulovirus* (GV), que antiguamente se les conocía como virus de la poliedrosis nuclear y virus de la granulosis respectivamente (Friesen, 2007). Estos virus envueltos poseen un genoma grande de DNA circular que va desde 80 a 230 kilopares de bases (kpb) y miden de 40 a 50 nm de diámetro por 200 a 400 nm de largo (Palomares et al., 2005).

Actualmente, uno de los baculovirus más usado en los IC-BEVS es el Nucleopoliedrovirus *Autographa californica* (*AcMNPV*), y entre las líneas celulares más usadas para los mismos se encuentran las Sf9 y Sf21 derivadas del tejido ovárico del insecto *Spodoptera frugiperda*, aunque también existen otras líneas muy usadas provenientes de los insectos *Trichoplusia ni* y *Mamestra brassicae* (Palomares et al. 2005).

El ciclo de vida del baculovirus se divide en las fases de infección muy temprana, temprana, tardía y muy tardía. Durante éstas, el baculovirus activa el encendido de genes que le permitirán llevar a cabo su replicación dentro de la célula huésped. Uno de los genes hiper-expresados en la etapa muy tardía de la infección es el que codifica para la proteína poliedrina. Esta proteína es necesaria para la supervivencia del baculovirus en la naturaleza, pero no lo es cuando éste se cultiva *in vitro* en células.

Tabla 2. Características relevantes de los IC-BEVS^a.

CARACTERÍSTICAS RELEVANTES DE LOS IC-BEVS	
1) SEGURIDAD:	<ul style="list-style-type: none"> • El espectro de infectividad de huéspedes de los baculovirus, generalmente está restringido a artrópodos. • Los baculovirus no infectan a vertebrados y se ha visto que sus promotores son inactivos en la mayoría de las células de mamíferos.
2) VELOCIDAD, SIMPLICIDAD Y CONFIABILIDAD:	<ul style="list-style-type: none"> • La construcción de un baculovirus recombinante es relativamente simple y rápida. • No se requiere invertir mucho tiempo y trabajo en la transfección, en la selección ó en la amplificación del recombinante. • Se requieren periodos de tiempo relativamente cortos para generar cantidades sustanciales de la proteína heteróloga.
3) VERSATILIDAD:	<ul style="list-style-type: none"> • Se han producido más de 500 diferentes tipos de proteínas recombinantes funcionales. • Se pueden incorporar genes de gran tamaño en el baculovirus. • Se pueden clonar varios genes en un solo baculovirus recombinante y expresarlos de manera simultánea para obtener proteínas multiméricas ensambladas correctamente. • También se puede coinfectar con diferentes baculovirus de manera simultánea para obtener el propósito mencionado arriba. • El IC-BEVS puede llevar acabo corte de intrones y emplame de exones (splicing). • La proteína heteróloga puede ser transportada a organelos, a membranas, e incluso puede ser secretada.
4) ALTOS NIVELES DE EXPRESIÓN:	<ul style="list-style-type: none"> • La proteína heteróloga puede llegar a ser hasta el 50% de la proteína celular total bajo las condiciones adecuadas. Lo anterior corresponde a casi 1 ng de proteína recombinante por célula. • La expresión en IC-BEVS, comparada con la expresión en células de mamífero, puede ser de 20 a 250 veces mayor. • Se pueden obtener hasta 500 mg de la proteína heteróloga por litro de cultivo.
5) MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES	<ul style="list-style-type: none"> • En el IC-BEVS se producen modificaciones tales como N- y O-glicosilación, fosforilación, acilación, α-amidación, amidación N-terminal, carboximetilación, isoprenilación, corte de péptido señal y actividad proteolítica.
6) CARACTERÍSTICAS PARA BIOPROCESOS:	<ul style="list-style-type: none"> • Las líneas celulares usadas en IC-BEVS pueden ser subcultivadas indefinidamente. • También pueden ser adaptadas fácilmente a cultivos en suspensión. • Se pueden alcanzar altas densidades celulares en las diferentes modalidades de cultivos empleados en bioprocesos. • Se pueden escalar grandes volúmenes de cultivo. • La expresión de la proteína heteróloga puede ser controlada simplemente por tiempo y la multiplicidad de infección • Se pueden construir de manera relativamente sencilla, proteínas fusionadas para facilitar la purificación o el monitoreo de la proteína heteróloga.

^aSe muestran las características del sistema de expresión baculovirus-células de insecto que han hecho de él uno de los sistemas de expresión heteróloga más importantes. Obtenida de Palomares et al. (2005).

Ya que la poliedrina está bajo el control de un promotor fuerte, en muchos casos la secuencia codificante para la poliedrina es sustituida por la secuencia codificante para la proteína heteróloga, generando así los baculovirus recombinantes (Palomares et al., 2005; Friesen, 2007).

En la actualidad se cuenta con varios IC-BEVS comerciales, que se basan en la expresión de la proteína heteróloga bajo el control del promotor de la poliedrina (Murphy et al., 2004; Yin et al., 2007). Uno de los sistemas de este tipo más usados es el sistema comercial Bac to Bac[®] de Invitrogen[™] (Kost et al., 2005; Murphy et al., 2004), mismo que se usó para alcanzar uno de los objetivos particulares de este trabajo (ver sección de “VI. Objetivos”, localizada abajo).

III.1.2. EL SISTEMA BAC TO BAC[®]

El sistema Bac to Bac[®] se basa en la transposición sitio específica de un cassette de expresión (proveniente del vector pFastBac1 que contiene ya el gen de interés) dentro de un plásmido que contiene el genoma del baculovirus (“bácmido”; ver figura 7). Este bácmido (bMON14272) de 136 kb, se propaga en la cepa DH10Bac[™] de *E. coli*, contiene un bajo número de copias del replicón mini-F, un marcador de resistencia a kanamicina y un segmento de DNA que codifica para el péptido LacZ α igual al del vector de clonación pUC. En la región que codifica para el extremo amino terminal de LacZ α , se encuentra insertado un pequeño segmento que contiene el sitio de unión para el transposón bacteriano Tn7 (el sitio mini-attTn7) y que no cambia el marco de lectura de dicho péptido. El bácmido puede complementar la delección de lacZ presente en el cromosoma bacteriano, permitiendo la formación de colonias de color azul (Lac⁺) en la presencia de un sustrato cromógeno como Bluo-gal o X-gal y un inductor como IPTG.

Dentro de las células DH10Bac ocurre la trasposición del elemento mini-Tn7 contenido en el plásmido de transferencia hacia el sitio de unión mini-attTn7 dentro del bácmido. Lo anterior es llevado a cabo por una actividad de transposasa codificada en un plásmido “auxiliar” (pMON7124) presente en las mismas células. Este plásmido auxiliar también le confiere a la bacteria la resistencia contra tetraciclina. El elemento mini-Tn7 en pFastBac1, presenta un cassette de expresión que contiene un gene de resistencia a gentamicina (Gm^r), el promotor de poliedrina del baculovirus *AcNPV* seguido de un sitio

múltiple de clonación y de la señal de poliadenilación del virus SV40, todo esto flanqueado por los brazos derecho e izquierdo del Tn7. Cuando ocurre la transposición del mini-Tn7 en el sitio de unión del mini-attTn7 del báculo, se interrumpe el marco de lectura abierto del péptido LacZ, por lo que las colonias que contienen el báculo recombinante son de color blanco en presencia de Bluo-gal ó X-gal y de IPTG (Bac to Bac[®], 2004).

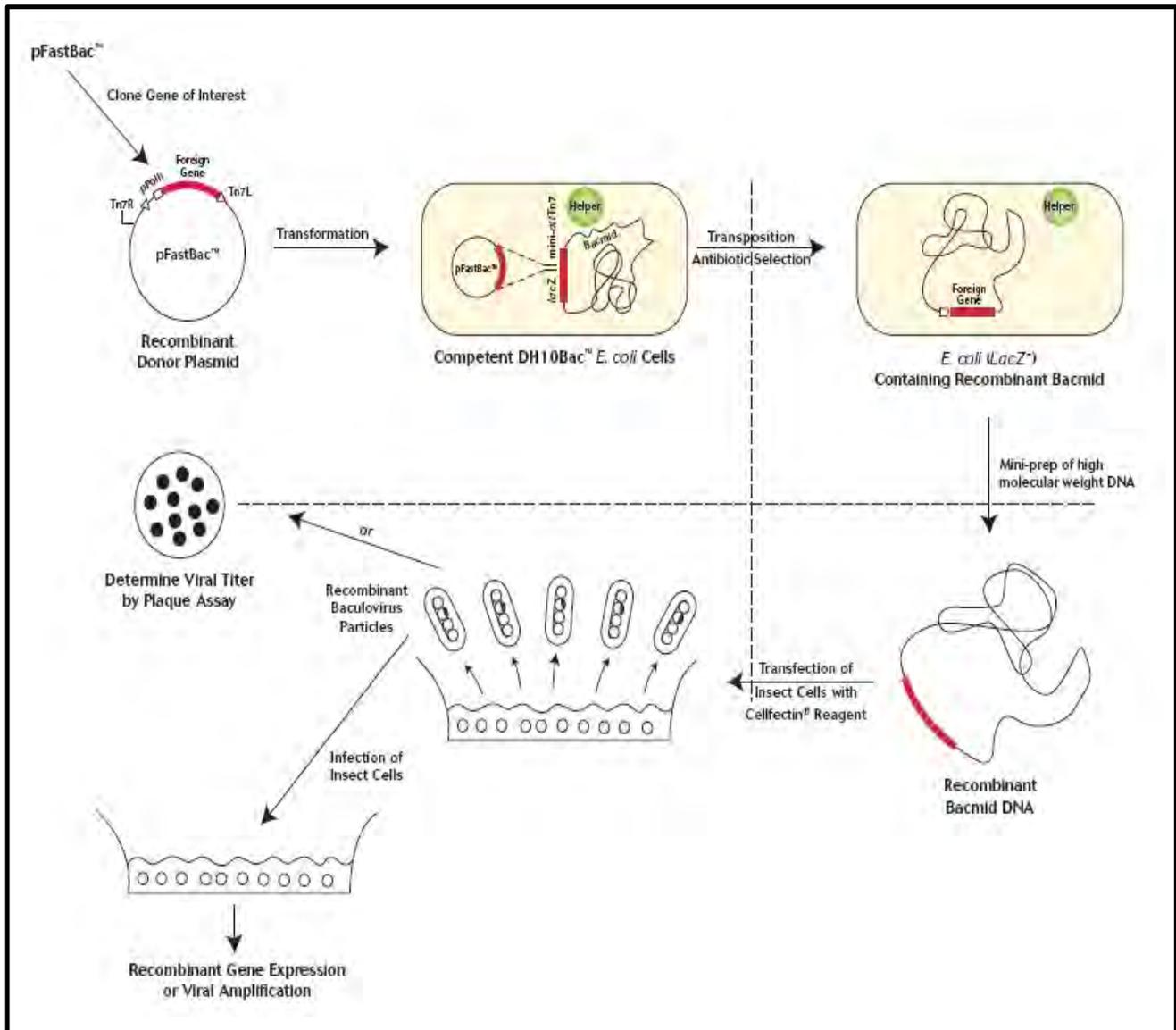


Figura 7.- Esquema del sistema Bac to Bac[®] de Invitrogen[™]. Modificada del manual del usuario. La descripción se encuentra en el texto.

III.2. ALTERNATIVAS A LA GENÉTICA REVERSA

Ya que no ha sido posible la generación de sistemas de genética reversa eficientes, sencillos y reproducibles para los miembros de la familia *Reoviridae*, se han desarrollado otros tipos de enfoques y diseños experimentales con menor grado de complejidad comparados con el que presentan los actuales sistemas de genética reversa, con el fin de poder generar herramientas que puedan ser útiles para el estudio de los mecanismos de entrada de estos virus a su célula huésped. Ejemplos de estos enfoques son la transcapsidación (Chen & Raming, 1993), la obtención de pseudo-partículas virales (VLPs, las siglas provenientes de “virus like particles”) y la reconstitución de TLPs a partir de DLPs y de las proteínas recombinantes de la capa externa de rotavirus (Trask & Dormitzer, 2006).

III.2.1. TRANSCAPSIDACIÓN

En la transcapsidación, las proteínas de la capa externa de una cepa de rotavirus son incubadas con DLPs de otra cepa diferente dando como resultado TLPs “quiméricas”. Chen y Raming (1993) demostraron que es posible obtener partículas infecciosas de un rotavirus “quimérico” al incubar las proteínas VP4 y VP7 del rotavirus de simio SA11-4F junto con DLPs de la cepa de rotavirus bovino B223. Cuando realizaron el experimento de transcapsidación utilizando las proteínas VP4 y VP7 provenientes de 1×10^{12} partículas virales del rotavirus cepa SA11-4F y el mismo número de DLPs del rotavirus cepa B223, los investigadores observaron un pequeño pero reproducible aumento en la infectividad de estas TLPs “quiméricas”. Cuando incubaron el mismo número de DLPs de la cepa B223 con las proteínas de capa externa de la cepa SA114F provenientes de cinco veces el número de DLPs (relación 5:1 de proteínas solubles y DLPs), la infectividad de las TLPs quiméricas se vio notablemente incrementada (entre 500 y 1000 veces más que con la relación 1:1), sentando el antecedente de que la relación entre las DLPs y las proteínas de capa externa del rotavirus es de gran importancia para recuperar la infectividad. Otro elemento importante que aporta este trabajo es el hecho de que los investigadores encontraron que la transcapsidación es independiente de la concentración de calcio siempre y cuando el pH sea ligeramente ácido (el óptimo fue a pH=5.4). Sin embargo, cuando la reacción se lleva a cabo a pH neutros se observa dependencia de calcio, ya que al agregarse

EDTA, la transcapsidación se inhibe. Aunque se demostró infectividad debida a la transcapsidación, esta reacción fue ineficiente ya que partiendo de las 1×10^{12} DLPs que se colocaron en el sistema, sólo se obtuvieron 1×10^6 unidades formadoras de placa (ufp).

III.2.2. ENSAMBLE DE PSEUDO-PARTÍCULAS VIRALES (VLPs)

Desde hace tiempo se ha demostrado que la incubación simultánea de proteínas estructurales de rotavirus, ya sea de origen viral silvestre (Ready et al. 1988) ó recombinantes (Labbe et al., 1991; Sabara et al., 1991), dan por resultado la formación de VLPs.

Redmond et al. (1993), utilizando un sistema de IC-BEVS, clonaron exitosamente los genes que codifican para las proteínas estructurales VP4, VP6 y VP7 del rotavirus bovino C486 y obtuvieron VLPs de esta cepa. Para que esto fuera posible los autores primero incubaron a la proteína VP6 recombinante para que produjera la base esférica en donde se ensamblarían posteriormente las recombinantes VP4 y VP7. Cabe mencionar que como fuente de VP4 y VP7 los investigadores usaron lisados de células de insecto infectadas por los baculovirus recombinantes (“extractos crudos”).

Por otra parte, Crawford et al., (1994) hicieron algo similar con los genes que codifican para las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7 del rotavirus de mono SA11. Estos investigadores obtuvieron diferentes tipos de VLPs co-expresando diferentes combinaciones de estas proteínas en células de insecto. Los autores demostraron que las VLPs conteniendo a la proteína VP4 podían unirse a las células MA104 de manera similar que el rotavirus SA11, aportando con esto, una prueba más de que VP4 es la proteína del rotavirus encargada de la unión a la célula huésped. Basado en los hechos de que las VLPs construidas con las 4 proteínas recombinantes poseen la capacidad de unirse a células susceptibles y que además estas proteínas en general mantienen las propiedades antigénicas similares a las TLPs, hacen de las pseudo-partículas virales un modelo prometedor para la generación de vacunas, para el estudio de las funciones de los dominios de las proteínas estructurales (que se pueden extrapolar a las funciones de las mismas ya formando parte de los viriones), y también para explorar epítopes involucrados en la unión a receptores celulares.

III.2.3. ENSAMBLE DE TLPs

Durante la obtención de VLPs a partir de proteínas recombinantes no se obtienen partículas infecciosas. Una nueva y prometedora estrategia para obtener herramientas alternas a la genética reversa, y así poder realizar estudios sobre la entrada del rotavirus a su célula huésped, fue desarrollada por Trask y Dormitzer (2006). Combinando los elementos claves de la transcapsidación y de la obtención VLPs, estos autores lograron ensamblar partículas infecciosas del rotavirus de simio RRV, utilizando como precursores a las DLPs y a las proteínas VP4 y VP7 de la misma cepa expresadas en el IC-BEVS. La infectividad obtenida de las DLPs tratadas con las proteínas VP4 y VP7 recombinantes se incrementó hasta 1×10^7 veces. Estos investigadores también encontraron que el ensamble de las proteínas recombinantes sobre las DLPs es dependiente del pH, obteniendo que, de todos los valores de pH usados, el óptimo fue de 5.2 unidades. También observaron que la reconstitución de TLPs depende de la temperatura. En un rango de temperaturas que abarca desde los 4 hasta los 30°C, la infectividad de las TLPs alcanza sus máximos valores mientras que a una temperatura de 37°C se obtiene una disminución de 100 veces respecto a la observada con las otras temperaturas. Se demostró también que el ensamblaje depende de la concentración de VP4 pero no de VP7, y que para obtener un óptimo ensamble de TLPs es necesario primero exponer a las DLPs con la proteína VP4 y posteriormente agregar a VP7 en presencia de calcio. A pesar de haberse obtenido una eficiencia de reconstitución de TLPs menor al 0.05%, hasta la fecha este es el primer reporte de la obtención de una partícula de rotavirus infecciosa reconstituida a partir de DLPs y de proteínas recombinantes de la cubierta externa del virus.

IV. JUSTIFICACIÓN

Dado que el desarrollo de sistemas de genética reversa eficientes y sencillos para estudiar los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis ocasionada por los virus miembros de la familia *Reoviridae* ha sido lenta (Boyce & Roy, 2007; Komoto et al. 2008), se requiere de alternativas que permitan establecer herramientas útiles para investigar el mecanismo de entrada de este virus a su célula huésped.

Ya que VP4 y VP7 son proteínas esenciales en la etapa inicial de la infección por rotavirus, el desarrollo de metodologías eficientes para incorporar a estas proteínas sobre DLPs y producir viriones infecciosos, generaría una herramienta muy útil para investigar el mecanismo de entrada de este virus a su célula huésped. Tal sería el caso de reconstituir TLPs que contengan modificaciones en las proteínas VP4 y VP7 mediante mutagénesis dirigida de los genes que codifican para éstas, para poder estudiar los dominios involucrados en la entrada del virus a la célula huésped.

El generar una herramienta de este tipo podría proveer la generación de conocimientos de potencial aplicación para el desarrollo de vacunas efectivas y la implementación de estrategias terapéuticas novedosas.

V. HIPÓTESIS

Es posible montar un sistema de reconstitución de partículas infecciosas (TLPs) de rotavirus a partir de partículas virales de doble cubierta (DLPs), tanto de cepas sensibles a NA como de cepas resistentes a NA, y de las proteínas recombinantes VP4 y VP7 sintetizadas en el sistema de baculovirus/células de insecto.

VI. OBJETIVOS

VI.1. OBJETIVO GENERAL:

Reconstituir partículas infecciosas de una cepa de rotavirus sensible a NA y de una cepa resistente a NA, a partir de sus correspondientes DLPs y de las proteínas recombinantes VP4 y VP7 obtenidas de un sistema de expresión IC-BEVS.

VI.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Construir baculovirus recombinantes que contengan los genes 4 y 9 del rotavirus de simio RRV (NA-sensible).
- 2) Montar un sistema de expresión IC-BEVS para producir las proteínas de cápside VP4 y VP7 del rotavirus RRV.
- 3) Purificar las proteínas VP4 y VP7 recombinantes.
- 4) Reconstituir partículas infecciosas (TLPs) de los rotavirus RRV y UK utilizando las proteínas recombinantes purificadas.
- 5) Evaluar la infectividad de las partículas reconstituidas de ambas cepas de rotavirus.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1. LÍNEAS CELULARES Y VIRUS

Para los ensayos de expresión de proteínas recombinantes, así como para aumentar el título viral de los baculovirus, se usó la línea celular Sf9, derivada de células de ovario del insecto *Spodoptera frugiperda* y amablemente donada por la Dra. Laura Palomares (IBT-UNAM). Las células Sf9 fueron cultivadas en monocapa utilizando frascos F25 (CORNING[®]), así como en suspensión (agitación orbital a 120 r.p.m.) utilizando matraces Erlenmeyer. El medio de cultivo utilizado fue el Sf-900IISFM de GIBCO[™] (Invitrogen Corporation[™]) y las células Sf9 fueron incubadas a 27 °C.

Para propagar los rotavirus y para los ensayos de infectividad de las TLPs reconstituidas se usó la línea celular MA104 (ATCC), derivada de células embrionarias de riñón de mono verde africano (*Cholorocebus aethiops*). Las células MA104 se cultivaron en monocapa utilizando el medio MEM Advanced[®], suplementado con 2% de suero fetal bovino, en un ambiente húmedo con 5% de CO₂ a 37 °C y utilizando frascos F75 (CORNING[®]).

La cepa de rotavirus RRV fue donada por el Dr. H. B. Greenberg (Stanford University, California, USA). La cepa de rotavirus UK fue obtenida del Dr. D. R. Snodgrass (Moredun Research Institute, Edinburgh, UK).

VII.2. DETERMINACIÓN DE LOS TÍTULOS VIRALES

El título viral de los lisados conteniendo a los rotavirus fue determinado como se describe en Arias et al. (1987).

La titulación de los baculovirus recombinantes fue realizada como se describe a continuación: Células Sf9 fueron sembradas en cajas de 96 pozos (CORNING[®]) y una vez alcanzada la confluencia, la monocapa fue infectada con diluciones seriadas de los medios conteniendo a los baculovirus recombinantes. Al cabo de transcurrir una hora de adsorción, fue retirado el inóculo y las células fueron lavadas un par de veces con medio Sf-900IISFM de GIBCO[™] Invitrogen Corporation[™] y se dejaron incubando por 48 h a 27 °C con medio fresco. Posteriormente las células fueron fijadas y tratadas con suero policlonal α -TLPs

siguiendo el protocolo descrito en Arias et al. (1987), incluyendo la visualización de focos infecciosos.

VII.3. VECTORES Y PLÁSMIDOS

pFastBac1. Se utilizó el vector pFastBac1 de Invitrogen™ (Fig. 8) como vector de transferencia de genes heterólogos para generar baculovirus recombinantes mediante el sistema comercial “Bac to Bac® Baculovirus Expression System” de la compañía Invitrogen™.

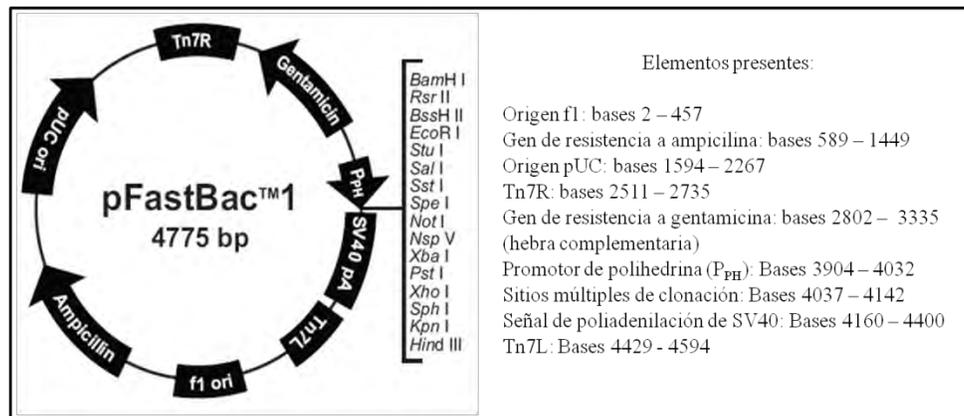


Figura 8.- Esquema del vector pFastBac1. Se muestran los elementos que conforman al vector. El tamaño del vector es de 4775 (pb).

pGEM-3Z-VP4RRV-3.2.1. Este plásmido (Fig. 9) fue construido hace algún tiempo en el laboratorio de los doctores C. Arias y S. López (Depto. de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, IBt-UNAM), mediante transcripción reversa y posteriormente reacción en cadena de la DNA polimerasa (RT-PCR) del gen 4 de rotavirus RRV. Se usaron los oligos YM9-3' y YM9-5' que dejan sitios SmaI en los extremos del producto amplificado por PCR. Estos sitios se aprovecharon para clonar el gen 4 en el sitio SmaI del sitio múltiple de clonación del vector pGEM-3Z.

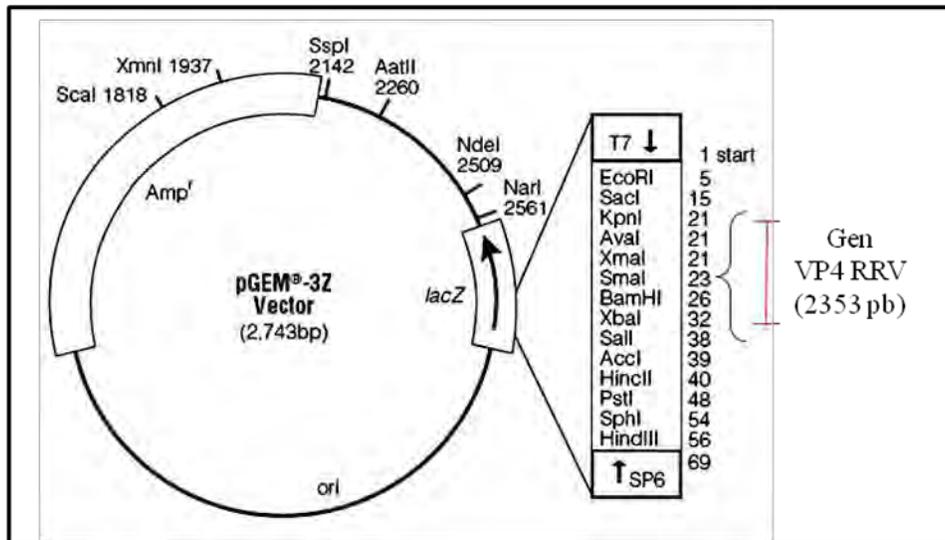


Figura 9.- Esquema del plásmido pGEM-3Z-VP4RRV-3.2.1. Se muestra el vector original y la posición dentro del mismo donde se encuentra clonado el gen 4 de rotavirus RRV. El tamaño del vector junto con el gen de RRV es de \approx 5096 pares de bases (pb).

pGEM-3Z-VP7RRV. Este plásmido (Fig. 10) fue construido hace algunos años en el laboratorio de los doctores C. Arias y S. López (Depto. de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, IBt-UNAM), mediante transcripción reversa y posteriormente reacción en cadena de la DNA polimerasa (RT-PCR) del gen 9 de rotavirus RRV. Se usaron los oligos YM9-3' y YM9-5' que dejan sitios SmaI en los extremos del producto amplificado por PCR. Estos sitios se aprovecharon para clonar el gen 9 en el sitio SmaI del sitio múltiple de clonación del vector pGEM-3Z.

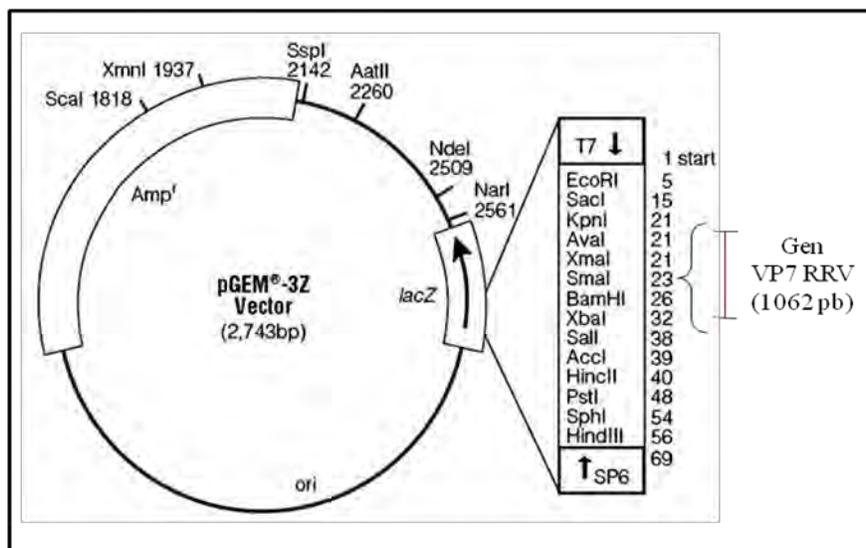


Figura 10.- Esquema del plásmido pGEM-3Z-VP7RRV. Se muestra el vector original y la posición dentro del mismo donde se encuentra clonado el gen 9 de rotavirus RRV. El tamaño del vector junto con el gen 9 de RRV es de ≈ 3805 pares de bases (pb).

VII.4. CONSTRUCCIÓN DE LOS BACULOVIRUS RECOMBINANTES

Los baculovirus recombinantes se construyeron siguiendo las indicaciones del manual de usuarios del sistema Bac to Bac[®] (2004), y empleando las técnicas convencionales de biología molecular y clonación descritas en “Current Protocols in Molecular Biology” (1995), y también en Sambrook et al. (1989).

VII.5. MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA

Se contaron y sembraron 2.4×10^5 células Sf9 sobre cubreobjetos de vidrio de 10 mm de diámetro y se infectaron con 100 μ l de sobrenadante proveniente de un cultivo en monocapa de células Sf9 de 4 días de infección con el baculovirus de interés, y se incubaron durante 48 horas bajo las condiciones descritas en la sección “Líneas celulares y virus”. Al cabo del periodo de incubación, las células se fijaron con paraformaldehído (Sigma[®]) al 2% (p/v) en PBS durante 20 minutos y posteriormente fueron lavadas 3 veces con una solución 50 mM de NH₄Cl en PBS (solución de lavado). Después fueron permeabilizadas con 0.5% (v/v) de Tritón X-100 (Sigma[®]) y 1% (p/v) de BSA (Sigma[®]) en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas fueron lavadas 3 veces

con la solución de lavado, posteriormente fueron tratadas con 1% (p/v) de BSA (Sigma) en solución de lavado durante 8 h a 4 °C, y al término de este periodo de tiempo, se lavaron 3 veces con la solución de lavado. Se les agregó una solución de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra las proteínas de interés, y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. La Tabla 3 muestra la dilución empleada para cada anticuerpo. Al cabo del periodo de incubación, se lavaron 10 veces con la solución de lavado y se agregó una solución de anticuerpos “anti-ratón” y “anti-conejo” acoplados a fluoróforos “Alexa” (Molecular probes™) según fue el caso (Tabla 3), y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente.

Después de lo anterior, las células fueron lavadas diez veces con la solución de lavado. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Molecular probes™) por 5 minutos y las células fueron lavadas 3 veces. Los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos de 76 por 26 mm. Las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (E600, Nikon™) acoplado a una cámara digital (DXM1200, Nikon™) y las imágenes se procesaron con el programa de computadora PhotoShop® (Adobe Systems™).

Tabla 3.- Anticuerpos utilizados en ensayos de microscopía de inmunofluorescencia^a.

Proteína de interés	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
VP4 Wa	HS2	1:500	α -ratón-Alexa	1:1000
	HS2	1:125	α -ratón-Alexa	1:1000
VP7 Wa	α -Wa	1:500	α -conejo-Alexa	1:1000
VP4 RRV	α -TLPs	1:500	α -conejo-Alexa	1:1000
	HS2	1:500	α -ratón-Alexa	1:1000
VP7 SA11	α -TLPs	1:500	α -conejo-Alexa	1:1000
VP4 SA11	α -TLPs	1:500	α -conejo-Alexa	1:1000
gp64	α -gp64	1:1000	α -ratón-Alexa	1:1000

^aSe indica el (los) anticuerpo(s) usado(s) para la detección de la proteína de interés así como sus diluciones empleadas.

VII.6. ENSAYOS DE WESTERN BLOT

a) Preparación de las muestras

Se contaron y sembraron 3×10^5 células Sf9 por pozo en cajas de 48 pozos. Éstas se infectaron con 300 μ l de sobrenadante proveniente de un cultivo en monocapa de células Sf9 de 4 días de infección con el baculovirus de interés y se incubaron durante 48 horas

bajo las condiciones descritas en la sección “Líneas celulares y virus”. Al término de la incubación se recolectaron los sobrenadantes y las células fueron lisadas con 60 µl de un buffer no desnaturizante [1% (v/v) Tritón X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 µg/ml de PMSF en etanol absoluto e inhibidores de proteasas (Complete[®], Roche[™]; se siguieron las instrucciones del producto)] y se centrifugaron a 9000 r.p.m. durante 10 minutos para retirar núcleos. Posteriormente, se mezclaron 40 µl de los lisados con 20 µl de buffer de carga para geles de acrilamidama [(50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% (p/v) de SDS, 0.1% (p/v) de azul de bromofenol, 10% (v/v) de glicerol, 1% (v/v) de β-mercaptoetanol] y se hirvieron por 5 minutos. De aquí se tomaron 15 µl para practicarles electroforesis en geles de poliacrilamida. Respecto a los sobrenadantes de las muestras, se precipitaron las proteínas solubles de 200 µl de éstos con 3 volúmenes de metanol absoluto y un volumen de cloroformo. Se centrifugaron las muestras a 13000 r.p.m. durante 5 minutos, se decantaron los sobrenadantes y la pastilla se resuspendió en 60 µl de buffer de carga y se hirvieron por 5 minutos. De aquí se tomaron 15 µl para analizarlos en geles de poliacrilamida.

b) Electroforesis

Se analizaron 15 µl de las muestras provenientes de células y de sobrenadantes en geles de SDS-poliacrilamida al 10% en buffer Tris-Glicina. Las muestras se corrieron a 80 volts en el gel concentrador [2 ml de H₂O tridestilada, 108 µl de Tris-HCl 2M pH 6.8, 330 µl de acrilamida-bis (30-0.8% p/v), 25 µl de SDS 10% (p/v), 25 µl de persulfato de amonio 10% (p/v) y 3 µl de TEMED] y a 120 volts en el gel separador [1.9 ml de H₂O tridestilada, 720 µl de Tris-HCl 2M pH 8.8, 1.33 ml de acrilamida-bis (30-0.8% p/v), 36.5 µl de SDS 10% (p/v), 25 µl de persulfato de amonio 10% (p/v) y 4 µl de TEMED].

c) Electrotransferencia e inmunotinción

Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, a 130 miliamperes durante una hora en amortiguador CAPS [ácido 1-ciclohexamin propanesulfónico 10mM pH=11, metanol 10% (v/v)]. Posteriormente la membrana se tiñó con rojo de Ponceau S [rojo de Ponceau S 0.1% (p/v) en ácido acético 5% (v/v)] para verificar la transferencia y después de lavarla 3 veces con Tween 20 al 0.1%

(v/v) en PBS, se bloqueó con leche descremada en polvo al 5% (p/v) en PBS durante 8 horas a 4 °C. Transcurrido este tiempo la membrana se incubó durante una hora en agitación a temperatura ambiente, con una solución del anticuerpo primario según fue el caso (Tabla 3) en 0.5% (p/v) de leche descremada en PBS.

Tabla 4.- Anticuerpos utilizados en ensayos de Western Blot^a.

Proteína de interés	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
VP4 RRV	HS2	1:5000	α -ratón- peroxidasa ó α -ratón-alexa 488	1:3000 ó 1:5000
	α -TLPs	1:3000	α -conejo- peroxidasa ó α -conejo-alexa 647	1:3000 ó 1:5000
VP7 RRV	α -TLPs	1:3000	α -conejo- peroxidasa ó α -conejo-alexa 647	1:3000 ó 1:5000

^aSe indica(n) el (los) anticuerpo(s) usado(s) para la detección de la proteína de interés así como sus diluciones empleadas.

Se hicieron tres lavados en agitación por diez minutos con Tween 20 al 0.1% (v/v) en PBS y posteriormente se incubó durante una hora a temperatura ambiente y en agitación con una solución de anticuerpo secundario (Tabla 3) en leche descremada al 0.5% (p/v) en PBS. Finalmente la membrana se lavó tres veces durante diez minutos con Tween 20 al 0.1% en PBS y la detección de las proteínas se realizó con el sustrato luminol (Perkin Elmer[®]) siguiendo las instrucciones del fabricante.

VII.7. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y PREPARACIÓN DE “EXTRACTOS CRUDOS”

Se inocularon medios de cultivo líquidos conteniendo una densidad celular de 1.5×10^6 células/ml de Sf9 y se infectaron con los baculovirus recombinantes a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.5 uff/célula. Las células se incubaron durante 3 días bajo las condiciones ya descritas. Al término de este periodo el medio de cultivo completo fue centrifugado a 1000xg durante 10 minutos. Para la preparación de los extractos crudos

con VP7 se separó el sobrenadante (SN) clarificado y se ultracentrifugó a 100,000xg durante 2 h. Al cabo de esto se rescató el SN y se le se le adicionó un cóctel de inhibidores de proteasas (“Complete EDTA free[®]” de Roche[™]) siguiendo las instrucciones del proveedor. El SN se almacenó a una temperatura de -20 °C hasta su uso. Para la preparación de extractos crudos con VP4 se centrifugaron los medios de cultivo de manera similar a los de VP7. Posteriormente se desechó el SN y las células fueron lisadas por el método reportado por Dormitzer et al. (2001).

VII.8. PURIFICACIÓN DE VP7 RECOMBINANTE

La purificación de VP7 de RRV recombinante se hizo mediante cromatografía de afinidad a concanavalina “A” y cromatografía de afinidad a anticuerpos monoclonales como se describe en Dormitzer et al. (2000). La cuantificación de la proteína VP7 de RRV purificada fue realizada empleando el producto “BioRad protein assay[®]” (BioRad[™]) siguiendo las instrucciones del proveedor. El acoplamiento del anticuerpo monoclonal 159 (Mab 159; Greenberg et al., 1983) a sefarosa se realizó como a continuación se describe: Un gramo de sefarosa 4B-CNBr (SIGMA-ALDRICH[®]) se colocó en 80 ml de HCl 1 mM durante 30 minutos. Al cabo de esto la resina fue lavada en una unidad de filtración (Millipore[®]) con 30 ml de HCl de la misma concentración y posteriormente fue colocada en un tubo cónico junto con 3 ml de NaHCO₃ 100 mM y 10 mg de Mab 159 previamente purificado mediante cromatografía de afinidad a proteína-G. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 10 h. Transcurrido el tiempo, la resina con el Mab 159 acoplado fue montada en la columna, lavada y equilibrada con el buffer indicado (Dormitzer et al., 2000).

VII.9. PURIFICACIÓN DE VP4 RECOMBINANTE

La proteína VP4 de RRV expresada en el sistema IC-BEVS fue purificada parcialmente mediante cromatografía de intercambio aniónico con DEAE-sefarosa (Sigma-Aldrich[®]). La columna de DEAE-sefarosa fue equilibrada con 10 volúmenes de un buffer conteniendo 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaCl y 1 mM EDTA. El lisado de células Sf9 infectadas con un baculovirus recombinante conteniendo el gene 4 de RRV (ver sección VII.6.), fue diluido 20 veces en el buffer de equilibrio de la columna DEAE-

sefarosa y se pasó a través de la misma. La elución de las proteínas se realizó con un gradiente discontinuo de NaCl, usando soluciones que contenían 20 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA aparte de la concentración de NaCl correspondiente.

VII.10. OBTENCIÓN DE TLPs y DLPs

Monocapas confluentes de MA104 se infectaron con una MOI de 10 ufc/célula con lisados de células del mismo tipo que previamente fueron infectadas con rotavirus RRV. Después de dejar pasar una hora de adsorción se agregó medio MEM sin suero. Las células infectadas se cosecharon a las 14 horas post-infección (hpi) y posteriormente se lisaron mediante tres ciclos de congelamiento/descongelamiento. El lisado viral se centrifugó durante 1 h a 4°C y a 40000 r.p.m. en el rotor SW45Ti (Bekman). Después se decantó el SN y la pastilla se resuspendió en TNC (Tris 10 mM pH=8.0, NaCl 140 mM, CaCl₂ 10 mM) y la mezcla se extrajo varias veces con freón hasta que la fase del solvente quedó transparente. La fase acuosa extraída se mezcló con 2.2 g de CsCl en un volumen final de 5 ml (para dar una densidad de 1.362 g/ml) y se centrifugó durante 18 h a 36000 rpm, a 4°C y usando el rotor SW55 (Bekman®). Las bandas opalescentes correspondientes a las TLPs se recolectaron por punción y se almacenaron a 4°C. Las partículas virales fueron desaladas usando Sephadex-G25 (Amersham Pharmacia Biotech®).

Para la obtención de DLPs, se siguió el protocolo descrito arriba con algunas excepciones. Después de lisar las células y del primer ciclo de centrifugación, el pellet fue resuspendido en TNE (Tris 10 mM pH=8.0, NaCl 140 mM, EDTA 5 mM). La extracción con freón, el gradiente de CsCl y la obtención de las partículas por punción se hizo de manera similar que para extraer TLPs. Las DLPs recién purificadas fueron llevadas a una concentración de EDTA 10 mM e incubadas por 30 minutos a 37 °C. Finalmente, las DLPs fueron pasadas por otro gradiente de CsCl en TNE, obtenidas por punción, almacenadas a 4°C y desaladas de la misma manera que las TLPs.

La concentración de las proteínas provenientes de las DLPs así como de las TLPs, fue cuantificada empleando el producto “BioRad protein assay®” (BioRad™) siguiendo las instrucciones del proveedor.

VII.11. ENSAYOS DE RECONSTITUCIÓN DE TLPs

Los ensayos de reconstitución de TLPs se llevaron a cabo empleando el método reportado por Trask & Dormitzer (2006). Para observar el ensamble de las proteínas recombinantes VP4 y VP7 de RRV sobre las DLPs de la misma cepa de virus y de la cepa UK, 10 μ l de la mezcla de reconstitución se pasaron a través de un colchón de sacarosa al 45% (w/v) en TNC y se centrifugaron las muestras a 140,000xg. Posteriormente se retiró el SN y el pellet fue resuspendido en 10 μ l de TNC durante toda la noche a 4 °C y éste fue analizado por WB usando el anticuerpo monoclonal HS2 y el suero policlonal “ α -TLPs” para identificar las proteínas estructurales que conformaban a las partículas. Dependiendo de la disponibilidad del lector de fluorescencia “Typhoon” (Amersham[®]), las membranas de WB se revelaron usando un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo ó con el método de quimioluminiscencia descrito en la sección de “VII.5. Ensayos de Western Blot”.

VII.12. ENSAYOS DE INFECTIVIDAD

Monocapas confluentes de células MA104 fueron inoculadas con 50 μ l de diluciones de la mezcla de reconstitución, misma que previamente fue tratada con 2.5 μ g/ml de tripsina (SIGMA-ALDRICH[®]) durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C y posteriormente con inhibidor de tripsina (SIGMA-ALDRICH[®]) a la misma concentración. Transcurrida una hora de adsorción se retiró la mezcla de reconstitución, las células se lavaron un par de veces con medio MEM sin suero (GIBCO[™] Invitrogen Corporation[™]) y posteriormente se incubaron en el medio mencionado durante 14 horas a 37 °C. Posteriormente las células fueron fijadas durante 30 minutos con acetona al 80% (v/v) en PBS. Al término de esto, las células fueron lavadas un par de veces con PBS e incubadas con una dilución 1:1000 del suero policlonal α -TLPs en PBS durante una hora a 37°C. Transcurrido esto, las células fueron lavadas dos veces con PBS e incubadas a 37 °C con una dilución 1:1000 de proteína A acoplada a peroxidasa de rábano (Amersham[®]) en PBS durante una hora y para la visualización de unidades formadoras de focos se usó el procedimiento descrito por Arias et al. (1987).

VIII. RESULTADOS

VIII.1. CONSTRUCCIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES

Para alcanzar el objetivo particular número 1: “Construir baculovirus recombinantes que contengan los genes 4 y 9 del rotavirus de simio RRV (NA-sensible).”, se utilizaron los vectores mencionados en la sección de “Materiales y Métodos”. A continuación se describe la construcción de cada uno de los baculovirus recombinantes.

VIII.1.1. CONSTRUCCIÓN DEL BR DE VP4 RRV

Para construir el baculovirus recombinante que exprese VP4 de RRV en células de insecto, se subclonó el gen 4 de RRV que se encontraba en el plásmido pGEM-3Z-VP4RRV-3.2.1. (Fig. 9; ver también sección “Materiales y Métodos”) en el vector pFastBac1. La construcción se realizó sacando el gen 4 de rotavirus RRV del plásmido mencionado usando las enzimas de restricción SmaI y Sall y clonando el gen en los sitios StuI y Sall del vector de transferencia. La construcción de este plásmido fue verificada mediante ensayos con enzimas de restricción (datos no mostrados).

El plásmido de transferencia pFastBac1-VP4RRV se usó para transformar células de *E. coli* cepa DH10Bac siguiendo el protocolo descrito en el manual del usuario del sistema Bac to Bac[®]. De la transformación de estas bacterias se aislaron ocho colonias y fueron extraídos sus bácmidos para analizarlos por PCR como se describe en la sección de “Materiales y Métodos”. Seis de los ocho bácmidos analizados contenían el gen 4 de RRV según los resultados de PCR (fig. 11). Para obtener los baculovirus recombinantes se transfectaron células de insecto con dos de los bácmidos (# 2 y 4) que presentaron el gen 4 de RRV.

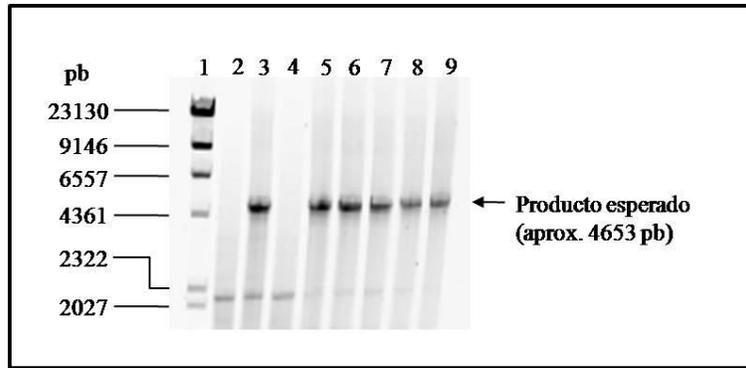


Figura 11.- Productos de PCR usando B cmidos VP4 RRV.
Carriles: 1.- Marcador de peso molecular, 2.- Clona1, 3.- Clona 2, 4.- Clona 3, 5.- Clona 4, 6.- Clona 5, 7.- Clona 6, 8.- Clona 7, 9.- Clona 8.

VIII.1.2. CONSTRUCCIÓN DEL BR DE VP7 RRV

El plásmido de transferencia pFastBac1-VP7RRV se obtuvo al subclonar el gen 9 de RRV contenido en el plásmido pGEM-3Z-VP7RRV (Fig.10) en el vector pFastBac1. La construcción se realizó sacando el gen 9 del plásmido usando las enzimas de restricción EcoRI y HindIII y clonando dicho gen en los mismos sitios localizados en el vector de transferencia. La construcción de este plásmido fue verificada mediante ensayos de restricción utilizando a la enzima MscI, ya que el gen 9 de RRV presenta un sitio de corte para esta enzima en la posición de nt 379 y el vector pFastBac1 presenta un sitio en la posición de nt 2707. En la figura 12-A se muestran los productos de digestión con esta enzima, de cuatro plásmidos candidatos. Se predice que un plásmido pFastBac1 conteniendo el gen 9 de RRV en orientación adecuada genera dos productos de aproximadamente 4075 y 1736 pb. Los cuatro plásmidos digeridos generaron los productos de digestión predichos confirmando la clonación del gen 9 de RRV dentro del vector de transferencia (Fig. 12-A).

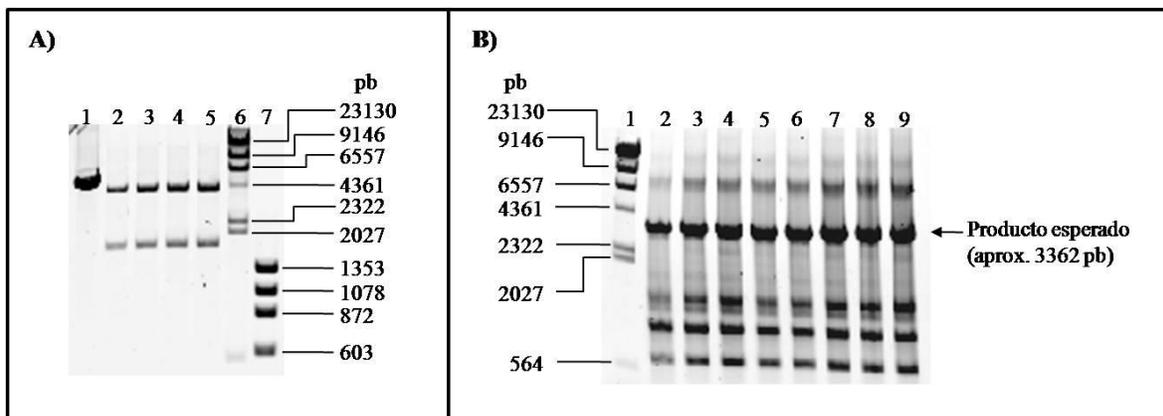


Figura 12.- Pruebas confirmatorias de clonación del gen 9 de RRV. A) Digestión de plásmidos pFastBac1-VP7RRV recombinantes. Los plásmidos provenientes de cuatro colonias se digirieron con la enzima MscI. Carriles: 1.- pFastBac1, 2.- clona 1, 3.- clona 2, 4.- clona 7, 5.- clona 8, 6 y 7.- Marcadores de peso molecular. B) Productos de PCR usando bácmidos VP7 RRV. Carriles: 1.- Marcador de peso molecular, 2.- clona 1, 3.- clona 2, 4.- clona 3, 5.- clona 4, 6.- clona 5, 7.- clona 6, 8.- clona 7, 9.- clona 8.

El plásmido de transferencia pFastBac1/VP7RRV proveniente de la clona 2 se utilizó para transformar bacterias *E.coli* cepa DH10Bac. Se eligieron ocho clonas de estas transformantes y se extrajeron sus bácmidos para analizarlos por PCR. Los productos de PCR obtenidos fueron del tamaño esperado, demostrando que todos los bácmidos contenían el gen 9 de RRV (Fig. 12-B).

Para obtener el baculovirus recombinante de VP7 de RRV se transfectaron los bácmidos provenientes de las clonas 3 y 7 en células Sf9 como se describe en el manual de usuarios del sistema Bac to Bac[®] (2004).

VIII.2. EXPRESIÓN DE VP4 Y VP7 RECOMBINANTES

Para alcanzar el objetivo particular número 2: “Montar un sistema de expresión IC-BEVS para producir las proteínas de cápside VP4 y VP7 del rotavirus RRV”, se infectaron monocapas confluentes de células Sf9 con los BR VP4 y 7 de RRV y se detectó la expresión de las proteínas recombinantes mediante microscopía de fluorescencia (datos no mostrados) y ensayos de Western blot, obteniendo resultados positivos.

A continuación se describe los resultados obtenidos para cada uno de los BR construidos.

VIII.2.1. EXPRESIÓN DE VP4 RRV

Para determinar el tamaño de la proteína recombinante expresada en Sf9 con el baculovirus “VP4RRV”, se montó un ensayo de Western blot con el lisado de células provenientes de la transfección del báculo de VP4RRV. La proteína VP4 de RRV se pudo detectar en este lisado utilizando un antisuero policlonal contra TLPs de rotavirus (Fig. 13).

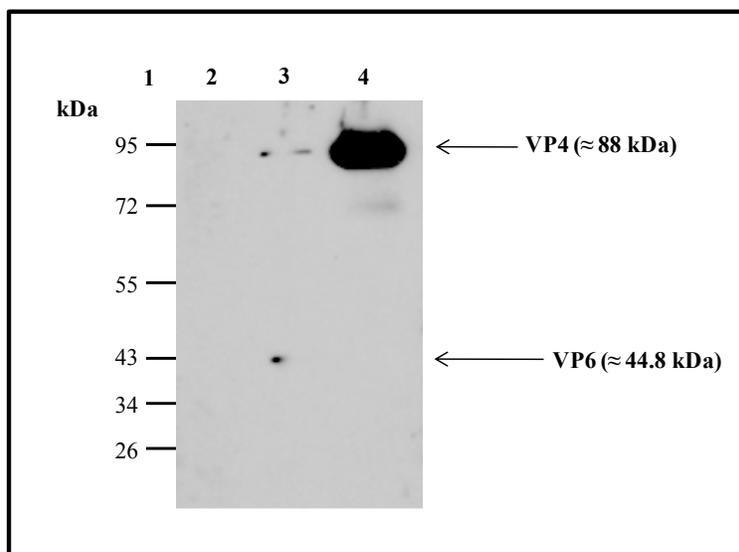


Figura 13.- Ensayo de Western Blot para detectar VP4 RRV recombinante. Se usó el suero policlonal α -TLPs para detectar a la proteína recombinante VP4 y a las proteínas de rotavirus. Carriles: **1.-** Marcador de peso molecular; **2.-** Lisado de células Sf9 infectadas con baculovirus silvestre; **3.-** Lisado de células MA104 infectadas con rotavirus RRV; **4.-** Lisado de células Sf9 infectadas con baculovirus VP4RRVc4.

La proteína VP4 de RRV recombinante (VP4r RRV), también pudo ser detectada en ensayos de WB utilizando el anticuerpo monoclonal HS2 (ver sección VIII.4. “Purificación de VP4”).

VIII.2.2. EXPRESIÓN DE VP7 RRV

Al igual que para el caso de VP4r RRV, se detectó la recombinante de VP7 de RRV (VP7r RRV) en un lisado celular obtenido de infectar una monocapa de Sf9 con una de las clonas de baculovirus recombinante “VP7RRV”. Como se observa en la figura 14, en este lisado se encontró una proteína que migra a la altura de la proteína VP7 de rotavirus RRV, lo cual sugiere que la proteína recombinante se expresa de manera correcta. La proteína VP7r RRV también fue detectada en el SN de cultivos tanto en monocapa como en agitación orbital (ver Fig. 15). Dado que la mayor parte de VP7 recombinante expresada en las células Sf9 se secreta al medio de cultivo (Redmon et al., 1993; Dormitzer et al., 2000), se obtuvieron los SN de los cultivos de esta células infectadas y se usaron como materia prima para la purificación de esta proteína de rotavirus.

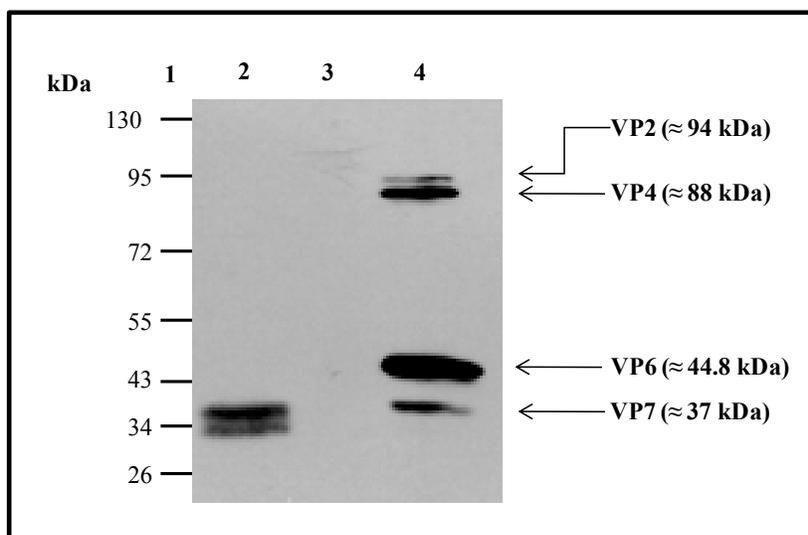


Figura 14.- Ensayo de Western Blot para detectar VP7r RRV. Se utilizó el suero policlonal α -TLPs para detectar a VP7 recombinante, así como a las proteínas estructurales de rotavirus RRV provenientes de un lisado de células MA104 infectadas con el mismo. Carriles: **1.-** Marcador de peso molecular; **2.-** Lisado de células Sf9 infectadas con baculovirus VP7RRVc7. **3.-** Lisado de células Sf9 infectadas con baculovirus silvestre; **4.-** Lisado de células MA104 infectadas con rotavirus RRV.

VIII.3. PURIFICACIÓN DE VP7

Como parte del objetivo particular número 3: “Purificar las proteínas VP4 y VP7”, se purificó a la proteína VP7 con base en el método descrito por Dormitzer et al. (2000). El sobrenadante de un medio de cultivo de células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante de VP7, se trató como se describe en la sección “VII. Materiales y métodos” y se pasó por una columna que contenía concanavalina A-sefarosa. Después de lavar la columna se eluyeron las proteínas adsorbidas al soporte físico y alícuotas del eluido se analizaron por gel (Fig. 15). Como se puede observar en el carril “ECoA”, este paso permitió enriquecer la muestra para glicoproteínas (Fig. 15-B, carriles 2 y 3). Las fracciones de la columna de CoA que contenían la proteína eluida con α -metil-manopiranosido se utilizaron en el segundo paso de purificación: La cromatografía de afinidad con el anticuerpo monoclonal 159. La proteína pudo ser detectada mediante WB en el extracto crudo, así como en el ECoA y en las primeras tres fracciones de elución de la columna de Mab159-sefarosa (Fig. 15-A, carriles 2, 3 y 4-6, respectivamente). La VP7r encontrada en las fracciones de elución número 2 y 3 provenientes de la cromatografía con Mab159-sefarosa (Fig. 15-B, carriles 5 y 6), parecen tener un 100% de pureza dado que no se observan bandas de otras proteínas contaminantes en el gel teñido con plata. La proteína de la fracción número 2 de elución se concentró por ultrafiltración y se cuantificó como se describe en la sección “VII. Materiales y Métodos”. La concentración de ésta fue de 0.204 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (5.455 μM). Debido a su alto grado de pureza, este concentrado de proteína fue usado para los ensayos de reconstitución. Se estima que la cantidad de VP7r RRV obtenida en el sistema de expresión fue de alrededor de 0.9 mg/l de cultivo.

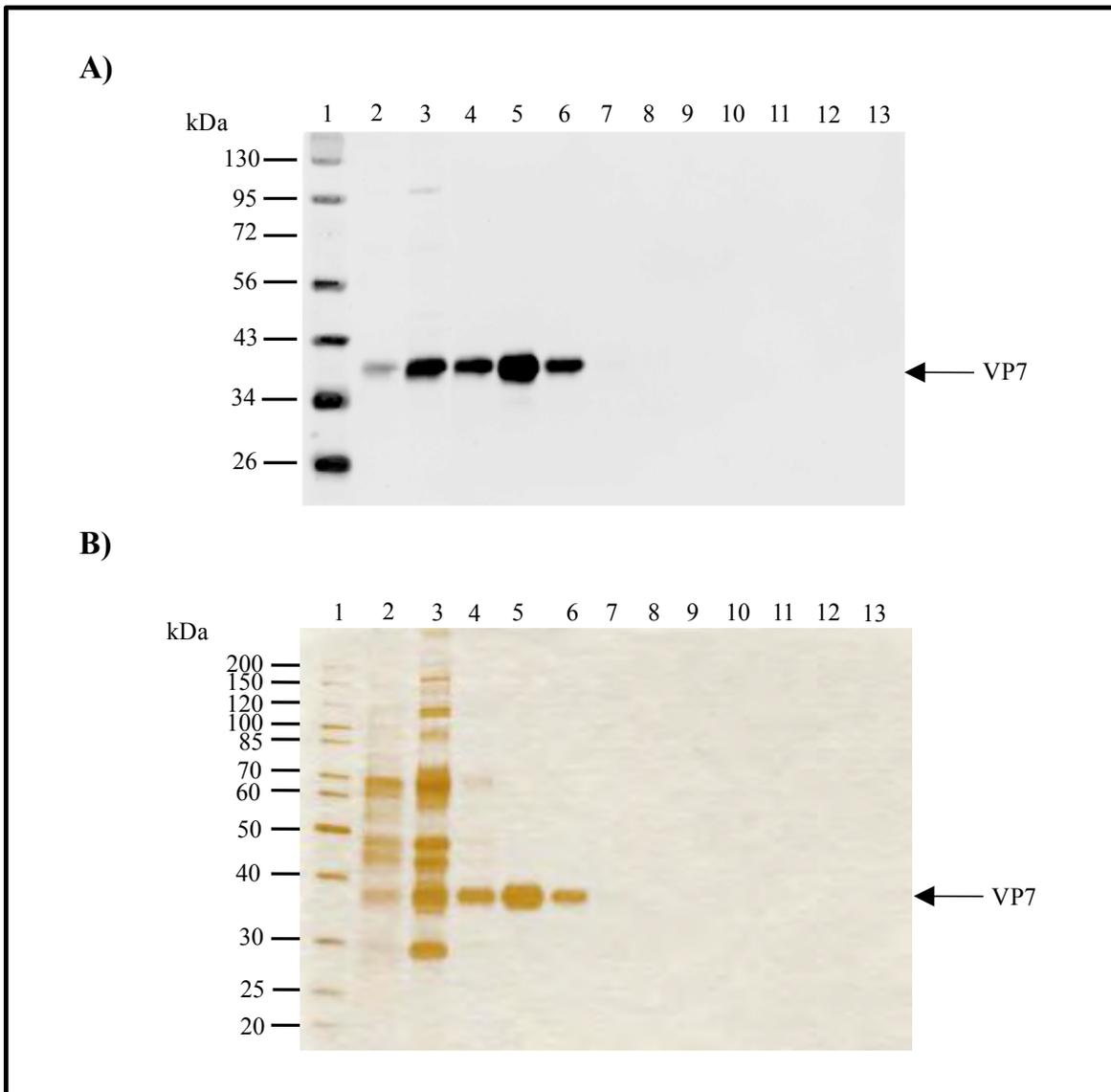


Figura 15.- Purificación de VP7. Muestras de las fracciones de elución provenientes de las cromatografías de afinidad para purificar VP7r de RRV fueron analizadas por Western Blot y por PAGE-tinción de plata (fracciones de elución = 1 volumen de columna). **A)** Ensayo de Western Blot. Se usó el suero policlonal α -TLPs para detectar a la VP7r RRV. Carriles: **1.-** Marcador de peso molecular, **2.-** SN VP7r, **3.-** ECoA, **4-13.-** Fracciones de elución de la #1 a la #10 de la cromatografía con Mab159-sefárosa. **B)** PAGE y tinción con plata. El orden de los carriles es el mismo que en el ensayo de WB.

VIII.4. PURIFICACIÓN DE VP4

La proteína VP4r de RRV se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico con DEAE-sefarosa. Las muestras provenientes de dicha cromatografía se muestran en la figura 16. La proteína VP4r RRV fue detectada en las fracciones de elución mediante ensayos de WB (Fig. 16-A) utilizando el anticuerpo monoclonal HS2 que detecta a la proteína VP5 (Padilla-Noriega et al. 1993). Las fracciones eluidas con 75, 100 y 125 mM de NaCl, contienen la mayor cantidad de VP4r RRV, al mismo tiempo que muestran una menor cantidad de proteínas contaminantes respecto al resto de las fracciones de elución como se puede ver en la figura 16-B. Estas tres fracciones de elución se mezclaron y se concentraron por ultrafiltración. Esta mezcla (el eluido de la cromatografía con DEAE: E-DEAE), se utilizó como fuente de VP4r RRV para los ensayos de reconstitución de TLPs.

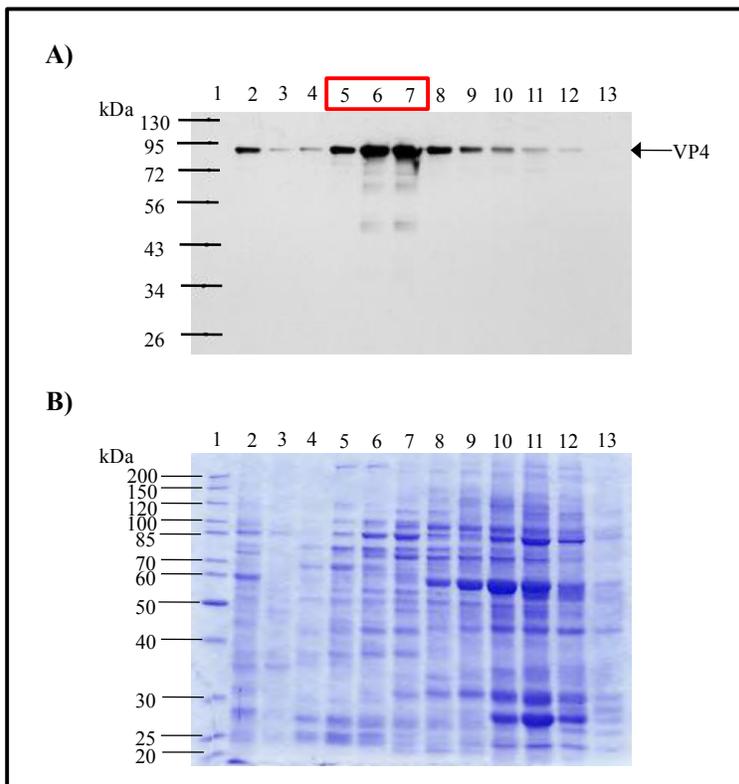


Figura 16.- Purificación parcial de VP4. Muestras de las fracciones de elución proveniente de la cromatografía de intercambio aniónico para purificar VP4r de RRV fueron analizadas por Western Blot y PAGE (Fracciones de elución = 1 volumen de columna). **A)** Ensayo de Western Blot. Se usó el Mab HS2 para detectar VP4r RRV. Carriles: **1.-** Marcador de peso molecular, **2.-** Lisado de Sf9/VP4r diluido 1:20, **3.-** Muestra de las proteínas que no se adsorbieron a la columna, **4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13.-** Fracciones de elución usando buffers con 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 mM de NaCl, respectivamente. **B)** PAGE y tinción con azul de Coomassie. El orden de los carriles es el mismo que en el ensayo de WB.

La cuantificación de VP4r RRV presente en E-DEAE se determinó con una curva patrón obtenida por densitometría de las bandas correspondientes a las proteínas VP4 y VP5 de RRV obtenidas por ensayos de WB al utilizar TLPs cuantificadas de esta cepa de virus y al anticuerpo monoclonal HS2 (Fig. 17-A). Con base en que VP4 representa el 11.77% de la masa de una TLP, se estimó la cantidad de VP4 presente en cada carril cuando se utilizan diferentes cantidades de TLPs (Fig. 17-B). Estos datos, junto con los datos obtenidos de la densitometría, permitieron obtener una “curva patrón de VP4” (Fig. 17-C), misma con la que se cuantificó la VP4r RRV presente en el E-DEAE.

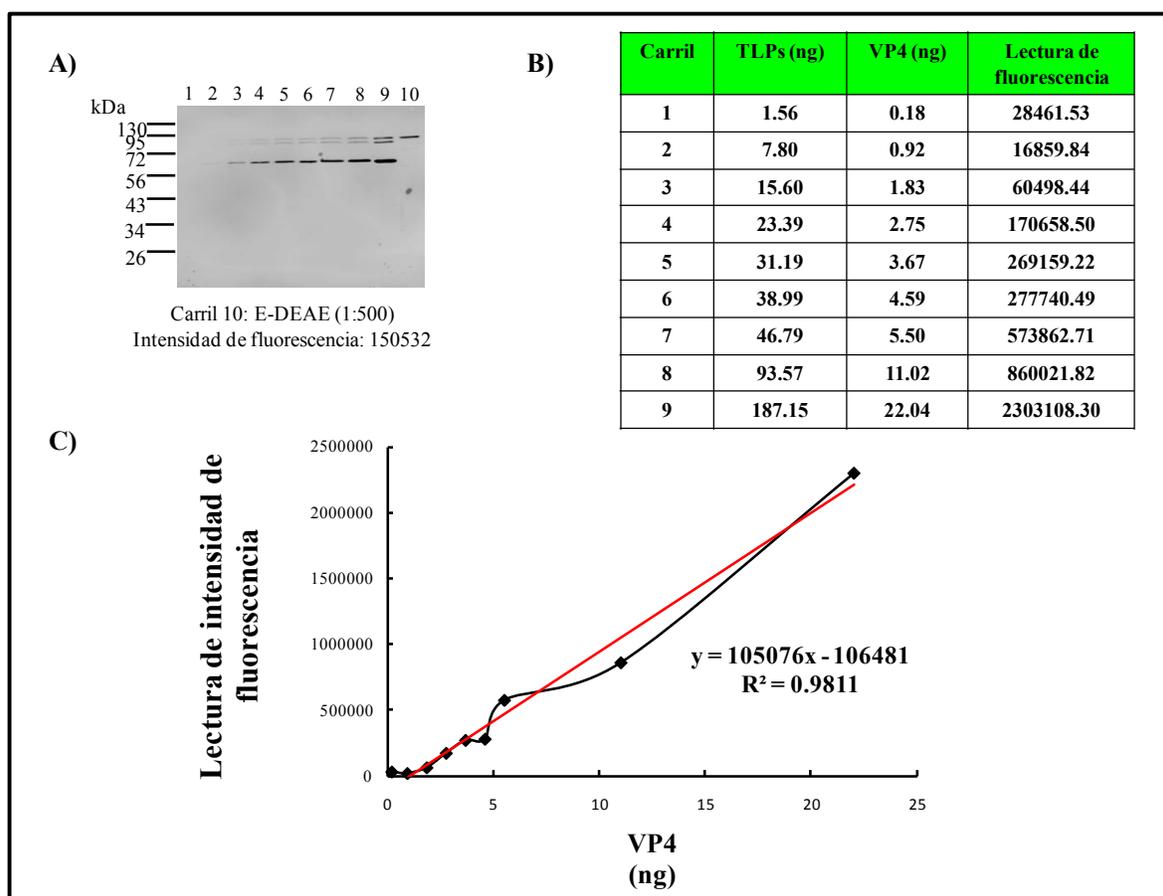


Figura 17.- Cuantificación de VP4r RRV en E-DEAE. **A)** Diferentes cantidades de TLPs purificadas con gradiente de CsCl fueron empleadas en ensayos de Western Blot usando el anticuerpo monoclonal HS2. **B)** Resumen de las cantidades de TLPs usadas para el Western Blot y datos de su densitometría. **C)** Curva patrón de VP4 generada al graficar las lecturas obtenidas de la densitometría vs la cantidad de VP4 en ng presente en cada carril del WB.

Al interpolar en la curva patrón el valor de la lectura de la densitometría correspondiente a la muestra (E-DEAE diluido 1:500) y tomando en cuenta la dilución, se calculó que la concentración de VP4r RRV presente en el E-DEAE es de 412.83 ± 5.163 ng/ μ l (4.77 μ M).

VIII.5. RECONSTITUCIÓN DE TLPs

Para cubrir el objetivo particular número 4: “Reconstituir partículas infecciosas de rotavirus”, se siguió el protocolo descrito en Trask & Dormitzer (2006) para ensamblar las TLPs y se hicieron ensayos de WB para detectar a las proteínas que conformaban a las partículas ensambladas. Dado que el ensamble de partículas infecciosas depende primordialmente de VP4, en los ensayos de reconstitución utilizando DLPs de RRV se probaron 2 concentraciones diferentes de VP4r RRV que nos garantizaran observar un incremento en la infectividad de las TLPs reconstituidas al ser comparada con sus respectivas DLPs según lo reportado por Trask & Dormitzer (2006). Para lo anterior se mantuvieron constantes las concentraciones de DLPs de RRV y de VP7r RRV. También se realizaron ensayos de reconstitución con DLPs de la cepa de rotavirus bovino UK y con las proteínas recombinantes del rotavirus cepa de simio RRV para probar si era posible obtener partículas infecciosas del rotavirus UK. Lo anterior sería importante para montar un sistema prometedor en el estudio de los diferentes mecanismos de entrada que presentan estas dos cepas de rotavirus (Gutiérrez-Mayret et al., 2009). En la tabla 5 se resumen las condiciones empleadas para los ensayos de reconstitución utilizando DLPs de RRV, así como DLPs de UK.

Tabla 5.- Resumen de los principales componentes de la mezclas de reconstitución^a.

Especie (concentración)	Condición “RRV 1”	Condición “RRV 2”	Condición “UK”
VP4r RRV (μM)	0.66	2.0	1.24
DLPs (nM)^b	2.7	2.7	1.3
VP7r RRV (μM)	1.1	1.1	1.1

^aLas concentraciones indicadas de cada componente se eligieron tomando como base concentraciones usadas en Trask & Dormitzer (2006). La estequiometría para la condición “RRV 1” fue de 1:3:1, para la condición “RRV 2” fue de 1:10:1 y para la condición “UK” fue de 1:12:2 (estequiometría de 1:1:1 = una partícula DLP por cada 120 moléculas de VP4 y 780 moléculas de VP7).

^bPara la condición “RRV 1” y “RRV 2” se utilizaron DLPs del rotavirus de simio cepa RRV. Para la condición “UK” se utilizó DLPs del rotavirus bovino cepa UK.

Después de seguir el protocolo de ensamble reportado (Trask & Dormitzer; 2006), parte de la mezcla de reacción se pasó por un colchón de sacarosa como se describe en

“Materiales y Métodos” y el pellet fue analizado por WB. En la figura 18 se muestra el ensayo de WB de uno de los tres experimentos independientes de reconstitución de TLPs, en donde se usó la concentración de VP4 correspondiente a la condición “RRV 1” (0.66 μ M; ver tabla núm. 4). La proteína VP7r RRV se detectó en la fracción del pellet obtenido posterior a haber sedimentado la partícula reconstituida a través de un colchón de sacarosa. La proteína se detectó exclusivamente en aquellas mezclas de reconstitución que contenían entre otras cosas, a la proteína recombinante VP7 RRV y DLPs de la misma cepa (Fig. 18-B, carriles 3, 5 y 6).

La proteína VP4r RRV proveniente de las mezclas de reconstitución bajo la condición “RRV 1” no se pudo detectar en los ensayos de WB (Fig. 18-A), probablemente debido a que fue insuficiente la cantidad de la misma presente en el pellet. En ensayos de reconstitución en donde la cantidad de VP4r RRV se incrementó (condición “RRV 2”, ver tabla núm.4) tampoco pudo ser detectada VP4r RRV (Fig. 19-A). Sin embargo, al igual que para la condición “RRV 1”, se detectó la presencia de VP7r RRV en los pellets provenientes de las mezclas de reconstitución de la condición “RRV 2” (Fig. 19-B, carriles 3, 4 y 5), lo cual sugiere que VP7r RRV se encuentra asociada a las DLPs de RRV.

Al hacer los ensayos de WB con las muestras de pellet provenientes de las mezclas de reconstitución de la condición “UK”, no fue posible detectar a ninguna de las proteínas estructurales de rotavirus. Sin embargo, al evaluar la infectividad de esta mezcla (ver sección “VIII.6. Infectividad de las TLPs reconstituidas”), se encontró que aumentaba casi 80 veces respecto al control proveniente de una mezcla de DLPs UK y los buffers de reacción (Fig. 20), lo que sugiere que sí hubo ensamble de partículas infecciosas aunque no pudiera ser detectado bajo las condiciones de WB empleadas.

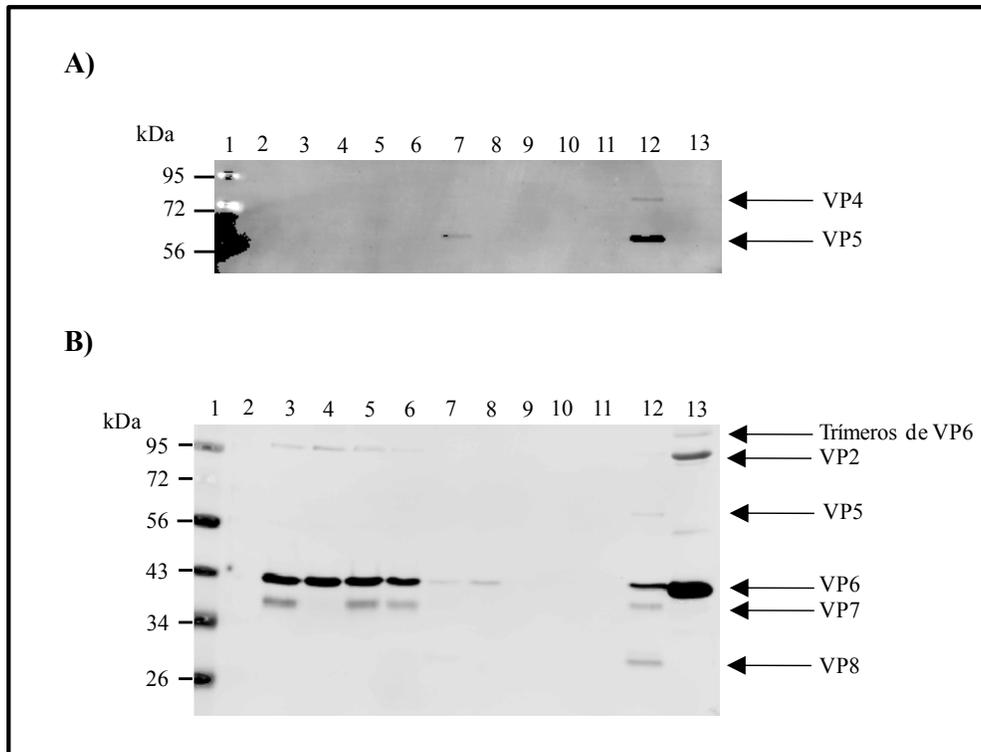


Figura 18.- WB de las muestras derivadas de las reacciones de reconstitución bajo las condiciones “RRV 1” y “UK”. Alícuotas de las mezclas de reconstitución de TLPs fueron pasadas por un colchón de sacarosa al 45% (w/v) como se indica en “Materiales y Métodos”. La fracción del pellet fue resuspendido en un volumen de TNC equivalente al de la alícuota de partida. Para ambos WB se usó un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo y fueron revelados como se indica en “Materiales y Métodos”. Se indican las bandas correspondientes a las proteínas estructurales de rotavirus. **A)** WB usando el anticuerpo monoclonal HS2 para detección de VP4 ó VP5. Carriles: 1.- Marcador de peso molecular, 2.- VP4r RRV, VP7r RRV y buffers de reacción pasadas por colchón de sacarosa, 3.- DLPs RRV y VP7r RRV pasadas por colchón de sacarosa, 4.- DLPs RRV pasadas por colchón de sacarosa, 5.- DLPs RRV, VP4r RRV y VP7r RRV (condición “RRV1”) pasadas por colchón de sacarosa, 6.- Duplicado del experimento de reconstitución del carril anterior, 7.- TLPs de RRV pasadas por colchón de sacarosa, 8.- TLPs de RRV tratadas con EDTA y pasadas por colchón de sacarosa, 9.- Buffers de reacción, 10.- DLPs UK y buffers de reacción pasados por colchón de sacarosa, 11.- DLPs UK, VP4r RRV y VP7rRRV (Condición “UK”) pasadas por colchón de sacarosa, 12.- TLPs RRV, 13.- DLPs RRV. **B)** WB usando el suero policlonal α -TLPs. Mismos carriles que en inciso A.

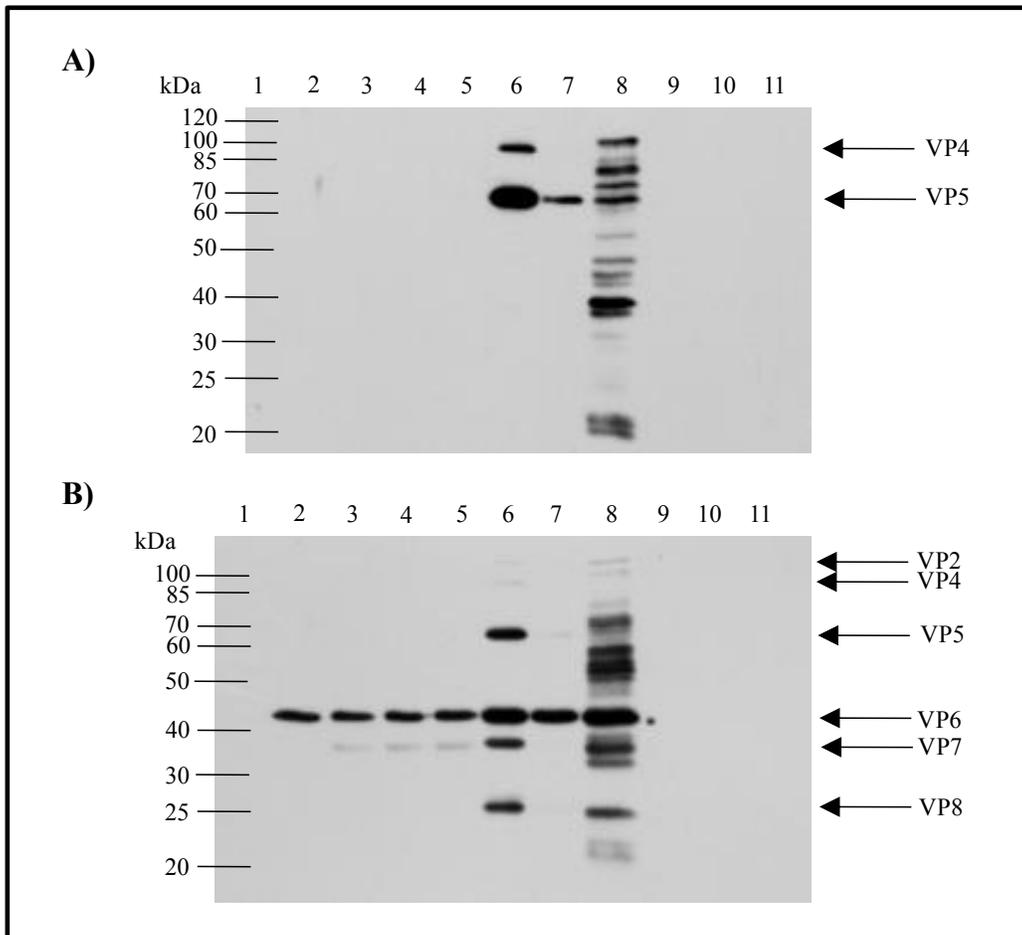


Figura 19.- WBs de las muestras derivadas de las reacciones de reconstitución bajo las condiciones “RRV 2” y “UK”. Alícuotas de las mezclas de reconstitución de TLPs fueron pasadas por un colchón de sacarosa al 45% (w/v) como se indica en “Materiales y Métodos”. La fracción del pellet fue resuspendido en un volumen de TNC equivalente al de la alícuota de partida. Para ambos WBs se usó un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y fueron revelados como se indica en “Materiales y Métodos”. Se indican las bandas correspondientes a las proteínas estructurales de rotavirus. **A)** WB usando el anticuerpo monoclonal HS2 para detección de VP4 ó VP5. Carriles: 1.- Marcador de peso molecular, 2.- DLPs RRV pasadas por colchón de sacarosa, 3.- DLPs RRV y VP7r RRV pasadas por colchón de sacarosa, 4.- DLPs RRV, VP4r RRV y VP7r RRV (condición “RRV2”) pasadas por colchón de sacarosa, 5.- Duplicado del experimento de reconstitución del carril anterior, 6.- TLPs de RRV pasadas por colchón de sacarosa, 7.- TLPs de RRV tratadas con EDTA y pasadas por colchón de sacarosa, 8.- Mezcla de reacción de reconstitución (condición “RRV2”), 9.- DLPs UK y buffers de reacción pasados por colchón de sacarosa, 10.- DLPs UK y VP7rRRV pasadas por colchón de sacarosa, 11.- DLPs UK, VP4r RRV y VP7rRRV (Condición “UK”) pasadas por colchón de sacarosa. **B)** WB usando el suero policlonal α -TLPs. Mismos carriles que en inciso A.

VIII.6. INFECTIVIDAD DE LAS TLPs RECONSTITUIDAS

Para cubrir el objetivo particular número 5: “Evaluar la infectividad de las partículas reconstituidas de ambas cepas de rotavirus”, se montaron ensayos de infectividad con las mezclas de reconstitución como se describe en “Materiales y Métodos”.

La mezcla de reconstitución correspondiente a la condición “RRV 1” mostró un aumento en la infectividad de casi 20 veces cuando se comparó con la infectividad de las DLPs y los buffers de reacción (control “RRV 1”, Fig. 20), así como con la mezcla en donde sólo se usó DLPs de la cepa RRV y VP7r RRV (dato no mostrado).

Al aumentar la cantidad de VP4r RRV en la mezcla de reconstitución (condición “RRV 2”) se observó un aumento en su infectividad de casi 130 veces (comparada con su control, Fig. 20).

También fue posible obtener partículas infecciosas cuando se usaron DLPs de la cepa de rotavirus UK y las proteínas recombinantes VP4 y VP7 de la cepa RRV para la reacción de reconstitución. La infectividad de la mezcla de reconstitución aumentó respecto a la del control (mezcla de DLPs de UK y buffers de reacción), de tal manera que se alcanzaron títulos cercanos a 4×10^4 uff/ml (Fig. 20).

Los datos anteriores indican que sí es posible reconstituir partículas infecciosas de una cepa de rotavirus NA-sensibles (de RRV en este trabajo y también en Trask & Dormitzer, 2006), así como de una cepa NA-resistente (UK), lo cual permitiría poder montar un sistema de este tipo para estudiar los procesos de entrada de estos virus a sus células huésped.

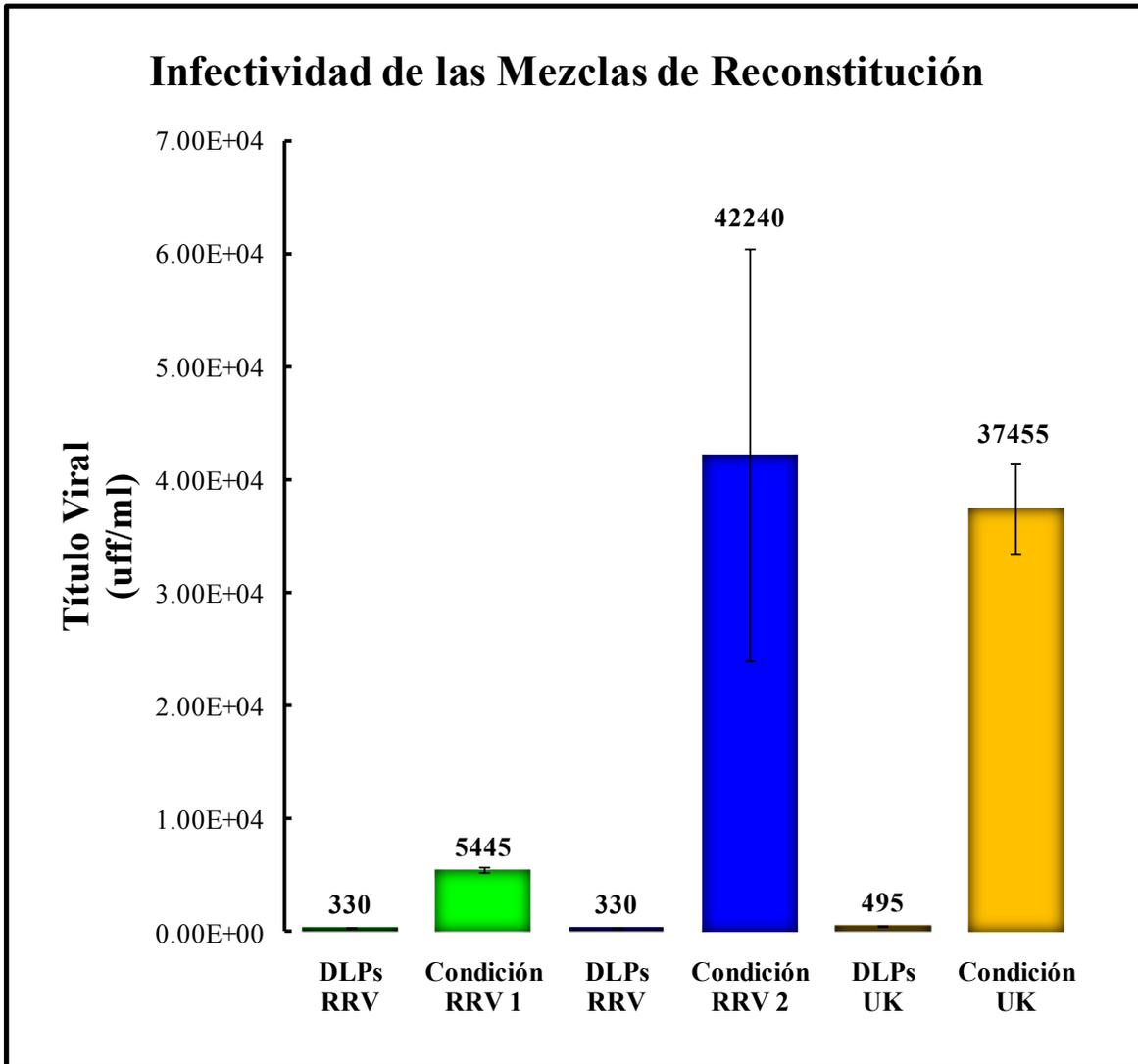


Figura 20.- Infectividad de las mezclas de reconstitución. Células MA104 fueron inoculadas con las diferentes mezclas de reconstitución de TLPs, así como con sus controles como se indica en “Materiales y Métodos” para determinar su infectividad. Las condiciones “RRV 1”, “RRV 2” y “UK” están definidas en la tabla número 5. Los controles “RRV 1”, “RRV 2” y “UK” se refieren a mezclas de DLPs de la cepa que se indica con los buffers de reacción de reconstitución. Para los casos de las condiciones “RRV 1” y “RRV 2”, se realizaron tres experimentos independientes de reconstitución, cada uno con su respectivo ensayo de WB y de infectividad. Para el caso de la condición “UK”, se realizaron dos experimentos independientes de reconstitución, cada uno con su respectivo ensayo de WB y de infectividad (ensayos representativos de WB se ilustran en las figuras 29 y 30). Para cada condición se muestra el promedio de la infectividad expresada en unidades formadoras de foco por mililitro (uff/ml) con su desviación estándar.

IX. DISCUSIÓN

IX.1. CONSTRUCCIÓN Y EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS VP4 Y VP7 RECOMBINANTES

Los resultados obtenidos de los ensayos de PCR realizados con cada bácmido generado (Fig. 11 y 12), indican que los genes 4 y 9 del rotavirus RRV, se insertaron en la región adecuada del bácmido, después del promotor de la polihedrina. Estos bácmidos se utilizaron para transfectar las células Sf9 y generar los baculovirus recombinantes de interés, los cuales expresaron las proteínas de rotavirus esperadas. La detección de las proteínas recombinantes VP4 y VP7 de rotavirus RRV mediante Western blot fue exitosa (Fig. 13 y 16 para VP4r RRV, 14 y 15 para VP7r RRV). Al utilizar el suero policlonal α -TLPs en dichos ensayos, fue posible detectar en el lisado de células Sf9 infectadas con el baculovirus portador del gen 4 de rotavirus una banda que migró a la misma altura que la proteína VP4 contenida en un lisado de células MA104 infectadas con RRV. Esto mismo se observó cuando se utilizó el anticuerpo monoclonal HS2 que detecta a VP4 y a la subunidad VP5 de esta proteína (Padilla-Noriega et al. 1993). Esta observación, en conjunto con el hecho de que en los experimentos de reconstitución se observó un aumento en la infectividad de las partículas virales, sugiere que la proteína se expresó de manera correcta y funcional. Estos datos concuerdan con reportes previos, en los cuales se ha mostrado que esta proteína VP4 es funcional tanto en el ensamble de VLPs como en el ensamble de partículas infecciosas de rotavirus (Redmond et al., 1993; Trask & Dormitzer, 2006), aparte de mantener su inmunogenicidad (Crawford et al., 1994; Redmond et al., 1993).

Para el caso de la proteína recombinante VP7 de RRV es claro que los anticuerpos detectan dos formas de VP7 (Fig. 14, carril 2). Este mismo patrón de doble banda se detectó también en SN libres de células que fueron congelados y descongelados varias veces durante su almacenamiento y uso, e incluso en los ensayos piloto de la purificación de VP7r RRV (datos no mostrados). Tomando en cuenta la concentración de Bis-acrilamida usadas en los ensayos de PAGE-WB para detectar a las proteínas recombinantes (10%), la banda de menor peso molecular pudiera deberse a: a) un producto de expresión de menor tamaño, b) un producto de proteólisis o c) una combinación de las opciones anteriores.

Al realizar la purificación preparativa de VP7r RRV (sección “VIII.3. Purificación de VP7”, Fig. 15) sólo se detectó una banda correspondiente al peso molecular de VP7 en las muestras provenientes de las diferentes etapas de purificación. Las diferencias entre las muestras que se usaron para detectar la VP7r RRV mostrada en las secciones “VIII.2.4. Expresión de VP7 recombinante” y “VIII.3. Purificación de VP7” radican en que, para la primera sección se usó un lisado de células Sf9 para detectar a la proteína recombinante en cuestión (previos procesos de congelamiento/descongelamiento), mientras que para la purificación de la misma, se usaron los sobrenadantes “frescos” (es decir sin congelar/descongelar) de los cultivos de las células infectadas. Tomando en cuenta estas observaciones, además de que:

- 1) La banda de mayor peso molecular detectada en el ensayo de WB usando lisados de Sf9 infectadas (Fig. 14), y la única banda detectada durante la purificación preparativa de VP7r migran a la misma altura que la proteína VP7 del rotavirus RRV,
- 2) El análisis bioinformático de la secuencia del gen 9 de RRV clonada en el vector de transferencia para generar el baculovirus recombinante predice un marco de lectura abierto similar al del gen codificante de VP7 del rotavirus RRV nativo sin la presencia de codones de paro prematuros,
- 3) Las células Sf9 poseen gran actividad de proteasas (Schmidt, 2004),
- 4) El lisado de células Sf9 usado para detectar de primera instancia la expresión de VP7r RRV por WB fue congelado/descongelado previo a su uso,
- 5) Nuestros datos son consistentes con reportes previos sobre la expresión de esta proteína en el sistema IC-BEVS (Dormitzer et al., 2000; Trask & Dormitzer, 2006), en los cuales se mostró que mantiene la misma inmunogenicidad que la presente en el rotavirus (Crawford et al., 1994; Redmond et al. 1993), y que
- 6) La proteína expresada y purificada es funcional de tal manera que es posible ensamblar trímeros, VLPs y TLPs con ella (Redmond et al., 1993; Trask & Dormitzer, 2006; el presente trabajo, ver secciones “VIII.5. Reconstitución de TLPs” y “VIII.6. Infectividad de las TLPs reconstituidas”);

Se puede concluir que: I) La proteína VP7r RRV se expresa de manera correcta y que II) La banda de menor peso molecular detectada en ensayos de WB usando α -TLPs y

lisados de Sf9 infectados con el baculovirus recombinante es probablemente un producto de proteólisis y no un producto de expresión de menor tamaño.

IX.2. PURIFICACIÓN DE VP7

Los ensayos de PAGE con tinción de plata y de WB utilizando muestras obtenidas de las fracciones de elución de las cromatografías de afinidad a CoA y al Mab159, demuestran claramente la presencia de las bandas correspondientes a la proteína VP7 (Fig 15-A y B). La cromatografía de afinidad a CoA permitió concentrar la VP7r RRV glicosilada en el eluido, como se muestra en la figura 15-A (comparar carriles número 2 y 3). El siguiente paso clave en la purificación de esta proteína fue la cromatografía de afinidad al Mab 159, la cual rindió suficiente cantidad de VP7r RRV para poder realizar los ensayos de reconstitución, además de obtenerse un grado de pureza similar al reportado (Dormitzer et al., 2000). Mientras que en el trabajo reportado por Dormitzer et al. (2000) la cantidad de VP7r RRV que obtuvieron por litro de cultivo de Sf9 estuvo en un intervalo de 0.25 a 0.5 mg, la cantidad de VP7r RRV obtenida en nuestro laboratorio fue de 0.9 mg/l. La diferencia observada entre los rendimientos de reportes previos y el observado en este trabajo puede deberse a que en el proceso de purificación de la VP7r RRV obtenida por Dormitzer et al. (2000) se hizo un paso adicional de purificación (filtración en gel), que en nuestro laboratorio no hicimos, lo que pudo causar, en su caso, pérdida adicional de la proteína.

Otros autores (Mellado et al., 2008) han reportado la purificación de VP7r RRV mediante otras estrategias que involucran cromatografía de afinidad a CoA, filtración en gel y cromatografía de intercambio aniónico, rindiendo una menor cantidad de proteína recombinante (0.2 mg/lit de cultivo de Sf9) con una pureza > 90%.

Utilizar dos pasos de afinidad para purificar VP7r RRV, tales como son las cromatografías de afinidad a CoA y al Mab159 representa ventajas sobre los métodos usados por Mellado et al. (2008), debido a que se obtiene mayor cantidad de proteína recombinante y mayor pureza de la misma, además de que las condiciones para la elución no son tan agresivas, de tal manera que el riesgo de desnaturalizar irreversiblemente a VP7r RRV se disminuye.

Con lo anteriormente expuesto se concluye que el método empleado para purificar VP7r RRV fue exitoso y nos permitió obtener suficiente cantidad de la proteína recombinante para realizar los ensayos de reconstitución de TLPs.

IX.3. PURIFICACIÓN DE VP4

La purificación de la proteína VP4 de RRV a partir de células Sf9 ha sido reportado previamente (Dormitzer et al., 2001), logrando un grado de pureza de 97% al utilizar cromatografía de intercambio aniónico y filtración en gel.

En nuestro caso, cuando se realizó la cromatografía de intercambio aniónico utilizando DEAE-sefarosa, fue posible obtener fracciones de elución que contenían una cantidad de VP4r RRV enriquecida (Fig. 16-A, carriles 5, 6 y 7), al eliminar muchas proteínas contaminantes, como se observa en la figura 16-B (carriles 8-13).

Dado que un reporte previo indicaba que es posible reconstituir partículas infecciosas de RRV usando lisados crudos de células Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes que poseen el gen 4 de RRV como fuente de VP4r RRV (Trask & Dormitzer, 2006), y ya que el objetivo general de la presente tesis es reconstituir partículas infecciosas de rotavirus, se decidió probar el eluido de la cromatografía con DEAE (E-DEAE) como fuente de VP4 para realizar los ensayos de reconstitución, obteniendo resultados positivos (secciones “VIII.5. Reconstitución de TLPs” y “VIII.6. Infectividad de las partículas reconstituidas”). Debido a lo anterior, se concluye que, aunque el E-DEAE contiene proteínas contaminantes, la VP4r RRV presente en el mismo fue de utilidad para la obtención de TLPs infecciosas y para cumplir los objetivos de esta tesis.

Actualmente, nos encontramos realizando intentos por obtener a la proteína VP4r RRV con mayor grado de pureza que, de acuerdo a lo observado por Trask et al. (2006), podría permitir incrementar la cantidad de partículas infecciosas reconstituidas.

IX.4. RECONSTITUCIÓN DE TLPs E INFECTIVIDAD DE LAS MISMAS

El análisis por WB de los ensayos de reconstitución (Fig. 18-B y 19-B) demuestran que, después de llevar a cabo la reacción de reconstitución de TLPs y de pasar por un colchón de sacarosa a las partículas existentes, la proteína recombinante VP7r RRV se

encuentra asociada a las DLPs de RRV, tanto en la presencia de VP4r RRV (Fig. 18-B carriles 5 y 6, y Fig 19-B carriles 4 y 5), como en su ausencia (Fig. 18-B carril 3 y Fig 19-B mismo carril). Aunque no se hizo densitometría de las bandas correspondientes a la VP7r RRV asociada a DLPs de RRV en ausencia o presencia de VP4r RRV, se puede apreciar que la cantidad de VP7r RRV asociada a las DLPs bajo las dos condiciones mencionadas no difiere mucho, lo que indica que VP4 no es indispensable para que VP7 pueda ensamblarse sobre las DLPs, tal como se ha observado en otros trabajos (Chen et al., 2009; Crawford et al., 1993).

El ensamble de la proteína VP7 de rotavirus sobre DLPs o sobre VLPs de doble capa, para dar lugar a una partícula de triple capa protéica ha sido documentado ampliamente (Chen et al., 1993; Chen et al., 2009; Crawford et al., 1994; Redmond et al., 1993; Trask & Dormitzer, 2006), y ha sido posible realizarlo en presencia o no de la proteína VP4 de rotavirus. Nuestros resultados sugieren que la proteína VP7r RRV se ensambla sobre las DLPs de la misma cepa, en las condiciones empleadas en este trabajo.

La proteína VP4r RRV no pudo ser detectada en las partículas provenientes de las reacciones de reconstitución pasadas por un colchón de sacarosa cuando éstas fueron analizadas por ensayos de WB usando al Mab HS2 y α -TLPs (Fig. 18-A y 19-A). La causa más probable de lo anterior es que la cantidad de VP4r RRV asociada a las partículas fuera tan pequeña que la sensibilidad de nuestro ensayo de WB no permitió detectarla, aunque no se puede descartar que la VP4 ensamblada se desprendiera de la partícula durante la centrifugación. Esto es posible dado que reportes previos sugieren que la proteína VP4 ensamblada puede tener ligeras diferencias estructurales con la presente en partículas de rotavirus nativas (Crawford et al., 2001).

Aunque no fue posible observar a la proteína VP4r RRV asociada a las TLPs de RRV reconstituidas, el hecho de haber observado un incremento en la infectividad de las mezclas de reconstitución respecto a sus controles (Fig. 20) provee evidencia de que fueron ensambladas partículas infecciosas de rotavirus durante la reacción de reconstitución ya que VP4 es una proteína indispensable para que el rotavirus pueda llevar a cabo la adsorción y entrada a la célula huésped (López & Arias, 2004 y 2006).

Las infectividad de las mezclas de reconstitución “RRV1” y “RRV2” (Tabla 4) se incrementó en casi 80 y 130 veces respectivamente cuando se compararon con sus

controles (Fig. 20). La infectividad obtenida en las mezclas de reconstitución por Trask & Dormitzer (2006), bajo condiciones de concentración de VP4, VP7 y DLPs similares a las que se usaron en la presente tesis, fue de mil y diez mil veces más que sus respectivos controles. La diferencia en la infectividad obtenida por estos autores y la generada en nuestro laboratorio pudiera deberse a las siguientes causas:

1) Uso de las proteínas purificadas casi al 100%. - Trask & Dormitzer (2006), utilizaron a las proteínas recombinantes con un grado de pureza mayor al 97%. En nuestro caso, sólo VP7r RRV tuvo este nivel de purificación, mientras que VP4r RRV se purificó sólo parcialmente a un nivel aproximado de 43% de pureza. La presencia de otras proteínas en el E-DEAE que pudieran interactuar con las proteínas recombinantes y DLPs podrían disminuir la eficiencia del ensamblaje.

2) Uso insuficiente de tripsina para activar al virus. En el trabajo de Trask & Dormitzer (2006) mencionan que usaron de 2.5 a 5 μg de tripsina por cada ml de mezcla de reconstitución. En nuestro caso, utilizamos 2.5 μg de tripsina por mililitro de mezcla de reconstitución. Se ha observado que cuando se incrementa la concentración de tripsina para activar al virus también ocurre un aumento en la infectividad del mismo (Arias et al., 1996); de tal manera que, al tratar los lisados de células infectadas con rotavirus con una concentración de tripsina de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, estos aumentan casi 25 veces su infectividad respecto a los que no fueron tratados. Repetir los ensayos de reconstitución de TLPs de RRV y de UK, aumentando la concentración de tripsina para activarlos, probablemente pueda incrementar la infectividad de las mezclas de reconstitución.

Por otra parte, el ensamble de VP7 de RRV sobre DLPs de UK fue reportado recientemente (Chen et al., 2009), y las partículas de triple capa proteica generadas, carentes de VP4, fueron usadas para analizar su estructura mediante criomicroscopía electrónica de alta resolución. Este reporte, en conjunto con el trabajo de transcapsidación generado por Chen et al. (1993), proveen la prueba de que es posible ensamblar a las proteínas de capa externa de una cepa de rotavirus sobre DLPs de una cepa diferente.

Con el objetivo de ensamblar TLPs de una cepa NA-resistente que nos permitiera probar la hipótesis de que es posible obtener partículas infecciosas de este tipo de cepa de rotavirus partiendo de sus DLPs y de las proteínas recombinantes VP4 y VP7, además de que en un futuro este tipo de TLPs nos permitiera caracterizar mejor el proceso de entrada

de los rotavirus, se intentó reconstituir partículas infecciosas usando DLPs de UK y a las proteínas recombinantes de capa externa de la cepa RRV. Es importante notar que, aunque no fue posible observar evidencia de la reconstitución mediante los ensayos de WB, fue posible observar un aumento en la infectividad de las mezclas de reconstitución respecto a su control (Fig. 20), lo que provee evidencia del ensamble de partículas infecciosas. Cabe mencionar que la eficiencia de reconstitución de TLPs obtenida en este trabajo fue cercana al 0.0001%, mientras que la obtenida en el trabajo de Trask & Dormitzer (2006) fue menor al 0.05%. Lo anterior sugiere que el ensamble *in vitro* de TLPs es ineficiente pero a pesar de ello, el número de partículas infecciosas de rotavirus obtenidas por reconstitución es suficiente para poder estudiar el proceso de entrada de los rotavirus a su célula huésped.

La infectividad observada en la mezcla de reconstitución con DLPs de UK (Fig. 20), así como la infectividad obtenida en las mezclas de reconstitución de las condiciones “RRV”, proveen evidencia del ensamble de partículas infecciosas de estas cepas de rotavirus y establecen dos puntos importantes:

- 1) El primer antecedente, de que es posible obtener partículas infecciosas de UK a partir de sus DLPs, de VP4r RRV y de VP7r RRV, y
- 2) Un sistema prometedor para poder estudiar los diferentes mecanismos de entrada que presentan las cepas de rotavirus RRV y UK (Gutiérrez-Mayret et al., 2009).

X. CONCLUSIONES

- 1) Se logró construir los baculovirus recombinantes portadores de los genes 4 y 9 de rotavirus cepa RRV. Esto se verificó mediante ensayos de digestión con enzimas de restricción, PCR y al conseguir expresar las proteínas recombinantes en células Sf9, siendo estas detectadas mediante microscopía de inmunofluorescencia (datos no mostrados) y ensayos de tipo Western Blot.
- 2) Las proteínas recombinantes VP4 y VP7 de RRV se lograron expresar de manera correcta, a juzgar por el peso molecular de los productos de expresión.
- 3) El sistema IC-BEVS montado para expresar VP4r RRV y VP7r RRV produjo cantidades similares de estas proteínas a las previamente reportadas.
- 4) La purificación de VP7rRRV fue exitosa. La proteína purificada se obtuvo en cantidad suficiente para realizar los ensayos de reconstitución.
- 5) La purificación parcial de VP4 rindió proteína recombinante suficiente para realizar los ensayos de reconstitución.
- 6) Fue posible reconstituir partículas infecciosas de una cepa de rotavirus NA-sensible (RRV) y de una cepa NA-resistente (UK).
- 7) La reconstitución de TLPs *in vitro* a partir de DLPs y de proteínas recombinantes VP4 y VP7 es ineficiente, pero a pesar de ello, el número de partículas infecciosas obtenidas es suficiente para poder estudiar el proceso de entrada de los rotavirus a su célula huésped.
- 8) El presente trabajo generó un sistema prometedor para poder estudiar los diferentes mecanismos de entrada que presentan las cepas de rotavirus RRV y UK.

XI. PERSPECTIVAS

Aún son poco comprendidos los mecanismos por los cuáles los virus no envueltos, es decir, que no contienen una bicapa lipídica en su exterior, logran entrar a su célula huésped (Isa et al., 2008; Tsai, 2007).

Para el caso de rotavirus se han identificado varios receptores y co-receptores celulares. Esto se logró por ensayos de bloqueo de infectividad mediante: 1) el tratamiento de las células con NA, 2) el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia los receptores propuestos, 3) el uso de los ligandos naturales de los receptores y, 4) el uso de péptidos sintéticos y proteínas recombinantes. El uso de estas estrategias también permitió caracterizar los dominios de las proteínas VP4 y VP7 involucrados en las primeras interacciones de este virus con su célula huésped (Isa 2008; López & Arias, 2004 y 2006).

A pesar de contar con estos avances, hasta la fecha no existen reportes en donde se haya probado la interacción directa entre los receptores y co-receptores celulares y los dominios de VP4 y VP7. Utilizar TLPs reconstituidas a partir de DLPs y de las proteínas VP4 y VP7 recombinantes que presenten mutaciones en los dominios de unión a los receptores celulares proveería la evidencia directa y determinante de la relevancia de éstos en la entrada de rotavirus, además de que podría también proveer información sobre el orden en que son requeridos los diferentes receptores en este proceso.

Por otra parte, apenas se comienzan a descubrir los mecanismos de endocitosis que utilizan los rotavirus para internalizarse en la célula (Gutiérrez-Mayret, 2007; Gutiérrez-Mayret, 2009; Sánchez-San Martín, 2004). Los datos generados en nuestro laboratorio sugieren que diferentes cepas de rotavirus pueden entrar por diferentes vías endocíticas en células epiteliales de riñón de mono (MA104). Ejemplo de lo anterior son la cepa de rotavirus UK que entra en la célula por la vía de endocitosis clásica mediada por clatrina, mientras que la cepa RRV entra por una vía de endocitosis independiente de clatrina y caveolina, pero dependiente de dinamina y flotilina.

Utilizar TLPs reconstituidas con DLPs de los rotavirus cepas RRV y UK, y las proteínas recombinantes VP4r RRV y VP7r RRV conteniendo mutaciones puntuales, podrían generar conocimiento sobre cuál o cuáles son las proteínas de capa externa implicadas en dirigir la entrada de este virus mediante una u otra vía de endocitosis.

Lo anterior permitiría explorar los mecanismos de entrada de estas dos cepas de rotavirus a la célula huésped y podría contribuir a la localización de las señales necesarias para activar diferentes vías de endocitosis, lo que hasta la fecha, es un campo de la biología celular poco explorado.

XII. REFERENCIAS

Aoki S, Settembre EC, Trask SD, Greenberg HB, Harrison SC, Dormitzer PR. (2009). “Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab”. *Science*. 324: 1444-1447.

Arias CF, Lizano M, López S. (1987). “Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity”. *J Gen Virol*. 68:633-642.

Arias CF, López S, Bell JR, Strauss JH. (1984). “Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SA11 as deduced from cDNA sequence”. *J Virol*. 50:657-661.

Arias CF, Romero P, Alvarez V, López S. (1996). “Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity”. *J Virol*. 70: 985-991.

Bac to Bac[®]. (2004). “Baculovirus expression system, users manual”. Version D. Invitrogen[™].

Boyce M, Celma C, Roy P. (2008). “Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts”. *J Virol*. 82: 8339-8348.

Boyce M, Roy P. (2007). “Recovery of infectious bluetongue virus from RNA”. *J Virol*. 81: 2179-2186.

Bridgen A, Elliott RM. (1996). “Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 15400-15404.

Chen D, Raming RF. (1993). “Rescue of infectivity by in vitro transcapsidation of rotavirus single-shelled particles”. *Virology*. 192: 422-429.

Chen JZ, Settembre EC, Aoki ST, Zhang X, Bellamy AR, Dormitzer PR, Harrison SC, Grigorieff N. (2009). “Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM”. *PNAS*. 106: 10644-10648.

Clarke ML, Lockett LJ, Both GW. (1995). “Membrane binding and endoplasmic reticulum retention sequences of rotavirus VP7 are distinct: role of carboxy-terminal and other residues in membrane binding” *J Virol*. 69: 6473-6478.

Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ. (1997). “Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 5389-5394.

Crawford SE, Labbé M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou YJ, Estes MK. (1994). “Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid protein in insect cells”. *J Virol.* 68: 5945-5952.

Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK, Lawton JA, Shaw AL, Raming RF, Prasad BVV. (2001). “Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike”. *J Virol.* 75: 6052-6061.

Cuadras MA, Méndez E, Arias CF, López S. (1998). “A new cysteine in rotavirus VP4 participates in the formation of an alternate disulfide bond”. *J Gen Virol.* 79: 2673-2677.

Current Protocols in Molecular Biology (2000). Ed. John Wiley & Sons.

Deming D, Sheahan T, Heise M, Yount B, Davis N, Sims A, Suthar M, Harkema J, Whitmore A, Pickles R, West A, Donaldson E, Curtis K, Johnston R, Baric R. (2006). “Vaccine efficacy in senescent mice challenged with recombinant SARS-CoV bearing epidemic and zoonotic spike variants. *Plos Med.* 3: 2359-2375.

Denisova E., Dowling W., LaMonica R., Shaw R., Scarlata S., Ruggeri F. y Mackow E.R. (1999). “Rotavirus capsid protein VP5* permeabilizes membranes”. *J Virol.* 73: 3147-3153.

Dormitzer PR, Greenberg HB, Harrison SC. (2000). “Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers”; *Virology.* 277: 420-428.

Dormitzer PR, Greenberg HB, Harrison SC. (2001). “Proteolysis of monomeric recombinant rotavirus VP4 yields an oligomeric VP5* core”. *J Virol.* 75: 7339-7350.

Dormitzer PR, Nason EB, Prasad BVV, Harrison SC. (2004). “Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus”. *Nature.* 430: 1053-1058.

Dormitzer PR, Sung ZY, Wagner G, Harrison SC. (2002). “The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site”. *The EMBO Journal.* 21: 885-897.

Dowling W, Denisova E, LaMonica R, Mackow ER. (2000). “Selective membrane permeabilization by the rotavirus VP5* protein is abrogated by mutations in an internal hydrophobic domain”. *J Virol.* 74: 6368-6376.

Estes MK, Graham DY, Smith EM, Gerba CP. (1979). “Rotavirus stability and inactivation”. *J Gen Virol.* 43:403-409.

Estes MK, Kapikian AZ. (2007). “Rotavirus”. Knipe DM et al., “*Fields Virology*”, 5th. Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Pages 1917-1974.

Fiore L, Greenberg HB, Mackow ER (1991). “The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin”. *Virology*. 181: 553-563.

Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, Palese P, Brownlee GG, Garcia-Sastre A. (1999). Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol*. 73: 9679-9682.

Friesen PD. (2007). “Insect virus”. Knipe DM et al., “*Fields Virology*”, 5th Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Pages .

Fuentes-Panana EM, López S, Gorziglia M, Arias CF. (1995). “Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses”. *J Virol*. 69: 2629-2632.

Gajardo R, Vende P, Poncet D, Cohen J. (1997). “Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein”. *J. Virol*. 71: 2211-2216.

Graham KL, Fleming FE, Halasz P, Hewish MJ, Nagesha HS, Holmes IH, Takada Y, Coulson BS. (2005). “Rotavirus interact with $\alpha 4\beta 7$ and $\alpha 4\beta 1$ integrins by binding the same integrin domains as natural ligands”. *J Gen Virol*. 86: 3397-3408.

Greenberg HB, Valdesuso J, van Wyke K, Midthun K, Walsh M, McAuliffe V, Wyatt RG, Kalica AR, Flores J, Hoshino Y. (1983). “Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus”. *J. Virol*. 47: 267-275.

Golantsova NE, Gorbunova EE, Mackow ER. (2004). “Discrete domains within the rotavirus VP5* direct peripheral membrane association and membrane permeability”. *J Virol* 78: 2037-2044.

Guerrero CA, Zárate S, Corkidi G, López S & Arias CF (2000). “Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells”. *J Virol*. 74: 9362-9371.

Gunn PR, Sato F, Powell KFH, Bellamy AR, Napier JR, Harding DRK, Hancock WS, Siegman LJ, Both GW. (1985). “Rotavirus neutralizing protein VP7: antigenic determinants investigated by sequence analysis and peptide synthesis”. *J Virol*. 54: 791-797.

Gutiérrez-Mayret M (2007). “Caracterización de la vía de entrada de la cepa humana de rotavirus Wa”. *Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Gutiérrez-Mayret M, Isa P, Sánchez-SanMartín C, Pérez-Vargas J, Espinosa R, Arias CF & López S (2009). “Different rotavirus strains may enter MA104 cells through different endocytic pathways: The role of clathrin-mediated endocytosis”. *Manuscrito sometido al Journal of Virology*.

Horimoto T, Kawaoka Y. (2006). “Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses”. *TRENDS in Molecular Medicine*. 12: 506-514.

Isa P, Arias CF, López S. (2006). “Role of sialic acids in rotavirus infection”. *Glycoconj J*. 23:27-37.

Isa P, Gutiérrez M, Arias CF, López S. (2008). “Rotavirus cell entry”. *Future Virol*. 3: 135-146.

Isa P, López S, Segovia L, Arias CF (1997). “Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotavirus”. *J Virol*. 71: 6749-6756.

Jayaram H, Estes MK, Prasad BVV. (2004). “Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication”. *Virus Research*. 101: 67-81.

Jiang X, Crawford SE, Estes MK, Prasad BVV. (2008). “Rotavirus structure”. In Patton J.T., “*Segmented Double-Stranded RNA Virus*”. Caister Academic Press. Pages 45-60.

Kabcenell AK, Atkinson PH. (1985). “Processing of the rough endoplasmic reticulum membrane glycoproteins of rotavirus SA11”. *The journal of the cell biology*. 101: 1270-1280.

Kabcenell AK, Poruchynsky MS, Bellamy AR, Greenberg HB, Atkinson PH. (1988). “Two forms of VP7 are involved in assembly of SA11 rotavirus in endoplasmic reticulum”. *Journal of Virology*. 62: 2929-2941.

Kobayashi T, Antar AAR, Boehme KW, Danthi P, Eby EA, Guglielmi KM, Holm GH, Johnson EM, Maginnis MS, Naik S, Skelton WB, Wetzel JD, Wilson GJ, Chappell JD, Dermody TS. (2007). “A reverse genetics system for dsRNA viruses”. *Cell Host & Microbe*. 1:147-157.

Komoto S, Kugita M, Sasaki J, Taniguchi K. (2008). “Generation of recombinant rotavirus with an antigenic mosaic of cross-reactive neutralization epitopes on VP4”. *J Virol*. 82: 6753-6757.

Komoto S, Sasaki J, Taniguchi K. (2006). “Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 4646-51.

Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. (2005). “Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells”. *Nature Biotechnology*. 23: 567-575.

Kozak, M. (1981). “Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes”. *Nucleic Acids Res*. 9: 5233-5250.

Labbe A, Charpilienne A, Crawford SE, Estes MK, Cohen J. (1991). “Expression of rotavirus VP2 produces empty core-like particles”. *J Virol*. 65: 2946-2952.

López S, Arias CF. (2004). “Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance”. *TRENDS in microbiology*. 12: 271-278.

López S, Arias CF, (2006). “Early steps in rotavirus cell entry”. *Current topics in microbiology and immunology*. 309: 39-66.

Maass DR, Atkinson PH. (1994). “Retention by the endoplasmic reticulum of rotavirus VP7 is controlled by three adjacent amino-terminal residues”. *J Virol*. 68: 366-378.

Mackow ER, Shaw RD, Matsui SM, Vo PT, Benfield DA, Greenberg HB. (1988). “Characterization of homotypic and heterotypic VP7 neutralization sites of rhesus rotavirus”. *Viol.* 165: 511-517.

Maruri-Avidal L, López S, Arias CF. (2008). “Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles”. *J Virol*. 82: 5368-5380.

Mellado M, Peixoto C, Cruz P, Carrondo M, Alves P. (2008). “Purification of recombinant rotavirus VP7 glycoprotein for the study of in vitro rotavirus-like particles assembly”. *J Chroma B*. 874: 89-94.

Murphy CI, Piwnica-Worms H, Grünwald S, Romanow WG, Francis N, Fan HY. (2004). “Expression of protein in insect cells using baculovirus vectors. Overview of the baculovirus expression system”. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc. Section II, unit 16.9, pages 1-10.

Neumann G, Kawaoka Y. (1999). “Genetic engineering of influenza and other negative-strand RNA viruses containing segmented genomes”. *Advances in Virus Research* 53: 265-300.

Neumann G, Whitt MA, Kawaoka Y. (2002). “A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned?”. *J. Gen. Virol.* 83: 2635-2662.

Padilla-Noriega L, Werner-Eckert R, Mackow ER, Gorziglia M, Larralde G, Taniguchi K, Greenberg HB. (1993). “Serologic analysis of human rotavirus serotypes P1A and P2 by using monoclonal antibodies”. *J Clin Microb.* 31: 622-628.

Palomares LA, Mondaca-Estrada S, Ramírez OT. (2005). “Principles and Applications of the Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System”. In Ozturk SS, Hu WS (2005), “*Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies*”. Ed. Taylor & Francis Group. Pages 627-692.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. (2003). “Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children”. *Emerging Infectious Diseases*. 9: 565-572.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. (2006). “Rotavirus and severe childhood diarrhea”. *Emerging Infectious Diseases*. 12: 304-306.

Poruchynsky MS, Tyndall C, Both GW, Sato F, Bellamy AR, Atkinson PH. (1985). “Deletions into an NH₂-terminal hydrophobic domain result in secretion of rotavirus VP7, a resident endoplasmic reticulum membrane glycoprotein”. *J Cell Biol*. 101: 2199-2209.

Prasad BVV, Burns JW, Marietta E, Estes MK, Chiu W. (1990). “Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy”. *Nature*. 343: 476-479.

Racaniello VR, Baltimore D. (1981). Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*. 214: 916-919.

Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, Kaelin K, Huber M, Dotsch C, Christiansen G, Billeter MA. (1995). “Rescue of measles viruses from cloned DNA”. *EMBO J*. 14: 5773-5784.

Ready KFM, Sabara MIJ, Babiuk LA. (1988). “In vitro assembly of the outer capsid of bovine rotavirus is calcium-dependent”. *Virology*. 167: 269-273.

Redmond MJ, Ijaz MK, Parker MD, Sabara MI, Dent D, Gibbons E, Babiuk LA. (1993). “Assembly of recombinant rotavirus proteins into virus-like particles and assessment of vaccine potential”. *Vaccine*. 11: 273-281.

Roner MJ, Nepliouev I, Sherry B, Joklik WK. (1997). “Construction and characterization of a reovirus double temperature-sensitive mutant”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 6826-6830.

Roner MR, Joklik WK. (2001). “Reovirus reverse genetics: Incorporation of the CAT gene into the reovirus genome”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 8036-8041.

Roner MR, Sutphin LA, Joklik WK. (1990). “Reovirus RNA is infectious”. *Virology*. 179: 845-852.

Sabara M, Parker M, Aha P, Cosco C, Gibbons E, Parsons S, Babiuk LA. (1991). “Assembly of double-shelled rotavirus like particles by simultaneous expression of recombinant VP6 and VP7 proteins”. *J Virol*. 65: 6994-6997.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. (1989). “Molecular cloning. A laboratory manual”. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez-San Martín C, López T, Arias CF & López S (2004). “Characterization of rotavirus cell entry”. *J Virol*. 78: 2310-2318.

Schmidt FR. (2004). “Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry”. *Appl Microbiol Biotechnol*. 65: 363-372.

Stirzaker SC, Both GW. (1989). “The signal peptide of the rotavirus glycoprotein VP7 is essential for its retention in the ER as an integral membrane protein”. *Cell*. 56: 741-747.

Svensson L, Dormitzer PR, Von BC, Maunula L, Greenberg HB. (1994). “Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly”. *J Virol*. 68: 5204-5215.

Taniguchi T, Palmieri M, Weissmann C. (1978). “QB DNA-containing hybrid plasmids giving rise to QB phage formation in the bacterial host”. *Nature*. 274: 223-228.

Taniguchi KW, Maloy L, Nishikawa K, Green KY, Hoshino Y, Urasawa S, Kapikian Z, Chanock RM, Gorziglia M. (1988). “Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus”. *J Virol*. 62: 2421-2426.

Trask SD, Dormitzer PR. (2006). “Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins”. *J Virol*. 80: 11293-11304.

Tsai B (2007). “Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm”. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 23: 23-43.

Wildt S, Gerngross T. (2005). “The humanization of N-glycosylation pathways in yeast”. *Nat Rev Microb*. 3: 119-128.

Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. (2007). “Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes”. *Journal of Biotechnology*. 127: 335-347.

Zárate S, Cuadras MA, Espinosa R, Romero P, Juárez KO, Camacho-Nuez M, Arias CF, López S. (2003). “Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5”. *J Virol*. 77: 7254-7260.

Zárate S, Espinosa R, Romero P, Méndez E, Arias CF, López S. (2000). “The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotavirus to cells”. *J Virol*. 74: 593-599.