

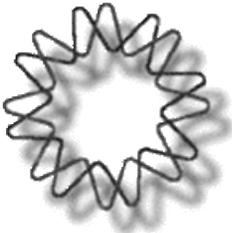


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE LA INFECCION POR ROTAVIRUS

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA :
Q.F.B. JOSE DE JESUS CARREÑO TORRES



CUERNAVACA, MORELOS

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Genética Molecular y Fisiología del Desarrollo del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Pavel Isa. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca 184820.

INDICE

| | |
|------------------------|----|
| 1 Abreviaturas | 2 |
| 2 Resumen | 3 |
| 3 Introducción | 4 |
| 4 Antecedentes | 26 |
| 5 Objetivos | 27 |
| 6 Materiales y métodos | 28 |
| 7 Resultados | 35 |
| 8 Discusión | 56 |
| 9 Conclusiones | 61 |
| 10 Perspectivas | 62 |
| 11 Referencias | 63 |

1 Abreviaturas

| | |
|-------------------|--|
| AS | Ácido siálico |
| BSA | Albúmina |
| CTB | Toxina de cólera |
| DLP | Partículas de doble capa |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetracético |
| ffu | Unidades formadoras de focos |
| GM1 | Gangliósido |
| GM3 | Gangliósido |
| GFP | Proteína verde fluorescente |
| hpi | horas post infección |
| hsc | Proteína de constitutiva de choque térmico |
| MA104 | Células epiteliales de riñón de mono |
| MEM | Medio mínimo esencial de Eagle |
| MOI | Multiplicidad de infección |
| NSP | Proteína no estructural |
| PBS | Solución salina de buffer de fosfatos |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNA _{dc} | Ácido ribonucleico de doble cadena |
| RNA _s | Ácido ribonucleico de cadena sencilla |
| RNA _m | Ácido ribonucleico mensajero |
| RRV | Rotavirus rhesus |
| T | Número de triangulación |
| TLP | Partículas de tres capas |
| Tx-Red | Fluoróforo Texas Red |
| SDS | Dodecilsulfato de sodio |
| VLP | Partícula parecida a virus |
| VP | Proteína viral |

2 Resumen

Los rotavirus son la causa principal de las diarreas virales deshidratantes severas en niños y causan aproximadamente 500 mil muertes por año. Una vez que los rotavirus entran a su célula huésped, pierden la capa mas externa, quedando como partículas de doble capa (DLP) las cuales son transcripcionalmente activas. Durante la infección, la acumulación de proteína viral en el citoplasma da lugar a la formación de estructuras electrodensas llamadas viroplasma. En estas estructuras se lleva a cabo la replicación del genoma viral y ensamblaje de las DLPs de la nueva progenie. En este trabajo observamos el virus marcado con Texas-Red unido a la célula colocandolo con moléculas de membrana (GM1 e integrina α -2) al permitir solo la unión del virus a la célula a 4°C. Después de una incubación a 37°C por 30 minutos, se observó que este virus ya no se encontraba colocandolo con la membrana celular. Posteriormente nos propusimos estudiar la dinámica de formación de los viroplasma en el citoplasma celular, para lo cual se utilizaron distintas multiplicidades de infección (MOI) (0.1, 0.5, 2.5 ó 10) y posteriormente se hizo la detección de viroplasma por inmunotinción a distintas horas post-infección (hpi). Se observó que la cantidad de viroplasma aumenta conforme transcurre el tiempo de la infección independientemente de la MOI y además es mayor la cantidad de viroplasma a MOI altas. El aumento en el número de viroplasma por célula correlacionó con la cantidad de proteína detectada por Western blot. La formación de viroplasma parece no estar directamente relacionada con el número de DLPs que ingresan a la célula ya que aún en células infectadas con una sola partícula viral, se observó la formación de más de un viroplasma por célula a tiempos tempranos (2 y 4 hpi). Dentro de este trabajo también observamos la producción de viroplasma a partir de las partículas virales marcadas, observando que los viroplasma no se forman alrededor de las DLPs que infectan la célula.

3 Introducción

3.1 Generalidades

La gastroenteritis infecciosa aguda es la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad en niños pequeños en los países en desarrollo con alrededor de mil millones de episodios diarreicos y entre 2.5 y 3.2 millones de muertes por año (56). Los rotavirus son la causa principal de las diarreas virales deshidratantes severas en niños y causan aproximadamente 500 mil muertes por año (58). Los rotavirus infectan diferentes especies animales, y particularmente en humanos son responsables de causar entre 60% y 80% de los casos de gastroenteritis infecciosas en niños menores de 2 años de edad. Es importante hacer notar que aunque la mortalidad debida a las infecciones por rotavirus es mucho mayor en países en desarrollo que en países desarrollados, la frecuencia de infección es muy similar en ambos. Debido al papel tan importante que tienen los rotavirus en las enfermedades diarreicas infantiles, y al hecho de que aun niveles de higiene avanzados parecen no ser suficientes para controlar significativamente las infecciones por estos virus, existe un interés considerable en desarrollar estrategias de vacunación que sean eficaces para controlar la severidad de la diarrea causada por estos virus (36, 55).

Los rotavirus humanos se observaron por primera vez en 1973, en micrografías obtenidas por microscopía electrónica de biopsias de duodeno de niños enfermos de diarrea no bacteriana. En las micrografías se observaba la presencia de partículas

virales de 100 nm de diámetro y debido a su apariencia similar a una rueda, lo llamaron rotavirus (del latín *rota*, rueda) (6).

La principal ruta de transmisión de los rotavirus es la vía fecal-oral, aunque también se ha propuesto que el contacto persona a persona, el contacto con secreciones respiratorias, y el contacto con superficies contaminadas pudieran ser fuentes de transmisión, ya que los altos índices de infección por estos virus en los primeros tres años de vida en todo el mundo son independientes de las condiciones higiénicas y sanitarias. La infección es especie-específica ya que la transmisión de rotavirus entre el hombre y animales no ha sido documentada, a pesar de que algunas cepas aisladas de humanos tienen una alta homología genética con las cepas aisladas de animales (52).

El tropismo *in vivo* de los rotavirus está limitado a los enterocitos maduros localizados en las puntas de las vellosidades del intestino delgado. Se ha propuesto que la destrucción de estos enterocitos es la causa de la diarrea (7); sin embargo, recientemente se ha propuesto que, parte de la diarrea es causada por la proteína NSP4 que estimula la secreción transepitelial de iones de cloro por una vía dependiente de calcio, lo que desequilibra el intercambio iónico de la célula, provocando la salida de agua (31). Adicionalmente, la diarrea ha sido atribuida a otros mecanismos, incluyendo mala absorción y la estimulación del sistema nervioso entérico (62).

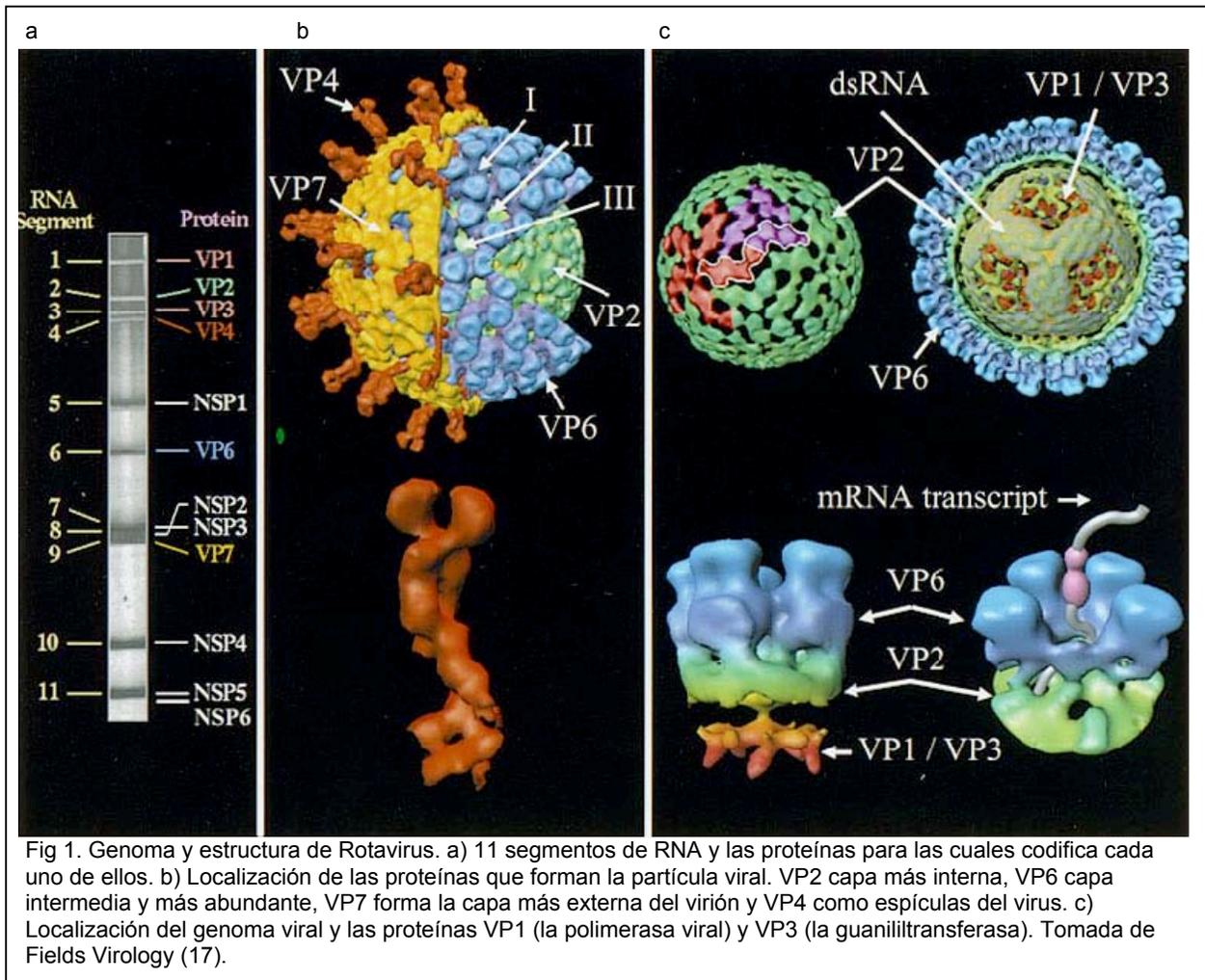
La vacuna Rotashield ha sido la más exitosa hasta el momento y consiste en una vacuna tetravalente rearreglante rhesus-humano, pero fue retirada del mercado 9 meses después de su lanzamiento, ya que se relacionó con un aumento en la incidencia de intususcepción (invaginación del intestino sobre sí mismo) en uno de cada 12,000 niños vacunados (5, 56). Actualmente se cuenta con 2 vacunas más, Rotarix desarrollada por Glaxo Smith Kline (GSK), una vacuna monovalente de rotavirus humano; y RotaTeq desarrollada por Merck, vacuna pentavalente de rotavirus bovino-humano. Actualmente sólo la vacuna RotaTeq cuenta con licencia aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) .

3.2 Estructura de los rotavirus

Los rotavirus, pertenecen a la familia *Reoviridae*; son virus no envueltos, compuestos por tres capas concéntricas de proteínas que engloban al genoma viral, el cual está compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena (RNA_{dc}) (18). El genoma codifica para doce proteínas: 6 son proteínas estructurales (VP's, por "viral proteins") las cuales forman un virión maduro; y 6 proteínas no estructurales (NSP's, por "non-structural proteins") las cuales participan en la replicación y maduración del virus. El "core", capa intermedia y capa externa, forman un virión completo compuesto de tres capas, el cual tiene una estructura icosaédrica, de aproximadamente 100 nm de diámetro (Fig. 1). La partícula infecciosa formada por las tres capas de proteína se denomina partícula de triple capa o TLP (Triple-Layered Particle), mientras que la partícula sin capa externa (sólo tiene dos capas de proteína), se denomina partícula de

doble capa o DLP (Double-Layered Particle). Las DLPs no son infecciosas pero sí transcripcionalmente activas. La capa externa del virión, con simetría $T=13$, está formada por 780 moléculas constituidas por trímeros de la glicoproteína VP7, que forma la superficie lisa, de la cual se proyectan 60 espículas constituidas por la proteína VP4. Las dos proteínas de la capa externa, VP4 y VP7, son las responsables de las interacciones iniciales del virus con la célula huésped. VP4 es cortado por tripsina resultando en 2 subunidades VP5 y VP8 y este corte está asociado con un aumento de la infectividad viral, además de estabilizar a la proteína (3).

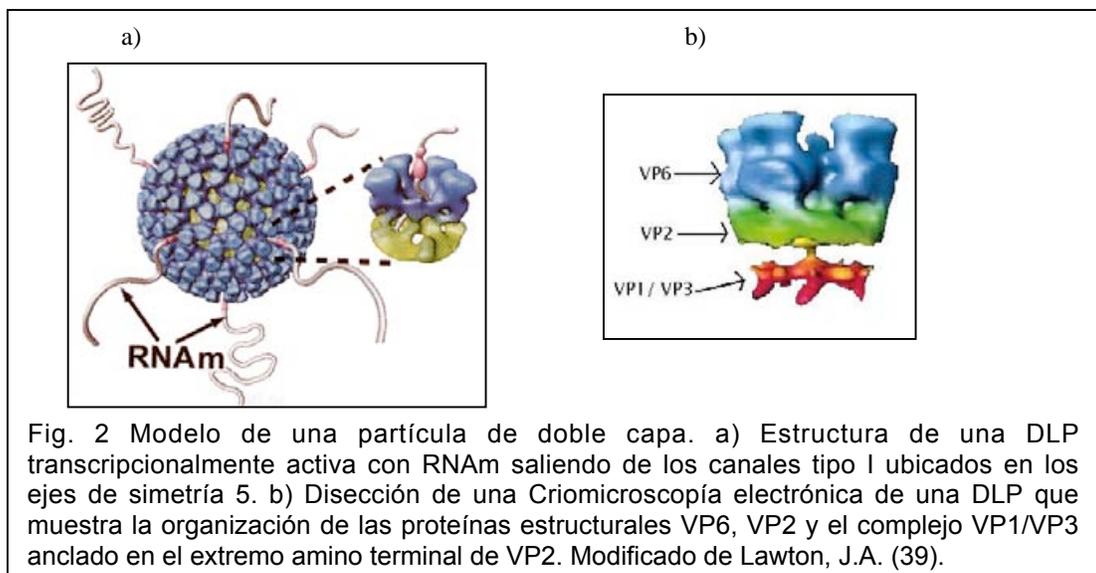
La capa intermedia del virión, con simetría $T=13$, está constituida por 260 trímeros de la proteína VP6, que es la proteína más abundante del virus, constituyendo aproximadamente el 50% de la proteína total del virión. La capa más interna del virión o "core", con simetría $T=1$, está formada por 120 moléculas de la proteína VP2 agrupadas en 60 dímeros, que engloban al genoma viral. Las proteínas VP1 y VP3 (RNA polimerasa dependiente de RNA y guanililtransferasa) están asociadas con la cara interna de la capa formada por VP2 (43, 58). Dentro de esta capa interna se encuentran los once segmentos de RNAdc que constituyen el genoma del virus (Fig.1).



Las partículas de rotavirus son relativamente estables. Las partículas virales son infecciosas en un intervalo de pH de 3 a 9 y, el virus es estable por meses a 4°C y aun a 20°C cuando se mantiene en 1.5 mM de cloruro de calcio (19, 54). La partícula completa mantiene su integridad y su infectividad cuando es tratada con solventes orgánicos tales como éter, cloroformo o freón, lo que refleja la ausencia de lípidos en su estructura (19, 48), pero pierde su infectividad al ser tratada con desinfectantes tales como formalina, cloro, betapropiolactona y etanol al 95%, quizá por la pérdida de la capa externa (65). Recientemente, se describió que un tratamiento del virus a pH 11.5

produce un cambio conformacional en las espículas de VP4, las cuales en una reconstrucción por crío-electromicroscopía aparecen atrofiadas y con una estructura de triple lóbulo. Además, en estas condiciones las partículas tratadas no son infecciosas (61). Por el contrario, a pH 2, no se observa cambio alguno en la estructura ni en la infectividad.

En la estructura del virus, se ha distinguido la presencia de 132 canales, los cuales conectan la superficie externa del virus con el core interno. Estos canales se han dividido en 3 tipos que se pueden distinguir de acuerdo a su posición y tamaño. Doce canales tipo I corren en los ejes de simetría 5 del icosaedro; 60 canales tipo II se encuentran en seis posiciones coordinadas alrededor de los ejes de simetría 5, y 60 canales tipo III se encuentran en 6 posiciones coordinadas alrededor del icosaedro en los ejes de simetría 3. Estos canales están involucrados en la importación de metabolitos necesarios para la transcripción de RNA y la exportación de los transcritos de RNA nacientes para procesos subsecuentes en la replicación viral (Fig. 2) (17).



3.3 Genoma viral

El genoma viral está constituido por 11 segmentos de RNAdc que se transcriben dentro de las DLPs. Los RNA mensajeros (RNAm) salen de esta estructura hacia el citoplasma celular por medio de los poros formados por VP2 (50). Los RNAm de rotavirus tienen la estructura de CAP en su extremo 5', pero a diferencia de la mayoría de los RNAm celulares, no tienen poli(A) en su extremo 3' (32, 45). Cada segmento de RNA codifica para una proteína viral, excepto el gen 11, el cual contiene dos marcos abiertos de lectura que codifican para dos proteínas virales. En la mayoría de los casos la traducción de los RNAm comienza en el primer codón de inicio que tiene las características del consenso de Kozak (37).

En la tabla 1 (Pág. 17) se describen las características y asignamiento a los segmentos de RNAdc de las proteínas de rotavirus.

3.4 Proteínas virales

3.4.1 Proteínas estructurales

La proteína **VP1**, producto del gen 1, tiene funciones tanto de transcriptasa como de replicasa viral y es considerada la RNA polimerasa dependiente de RNA, por las siguientes razones: a) La secuencia de la proteína contiene regiones que tienen similitud con motivos conservados entre las RNA polimerasas dependientes de RNA de

otros virus (12); b) VP1 está presente en partículas virales transcripcionalmente activas y se puede entrecruzar con el RNAm, utilizando luz ultravioleta como agente entrecruzador (60); c) VP1 es un componente común de las partículas virales con actividad de RNA polimerasa (transcriptasa o replicasa) (23). Además al coexpresar los genes de VP1 y VP2 en células de insecto, las proteínas forman complejos que tienen la propiedad de sintetizar RNAdc *in vitro* a partir de RNAm viral (70).

La proteína **VP2**, producto del gen 2, consta de 881 aminoácidos (aa); es la proteína más abundante de la nucleocápside y constituye la capa más interna del virus. VP2 es capaz de unirse a RNAs de cadena sencilla o doble, aunque tiene una mayor afinidad por los RNAs de cadena sencilla (RNAs); esta función podría estar relacionada con el empaquetamiento de los RNAs virales dentro de la nucleocápside (38).

La proteína **VP3** es codificada por el segmento 3 de RNA, consta de 835 aa y se le ha atribuido la actividad de guanililtransferasa del RNA viral, la cual se encarga de adicionar la estructura de CAP a los RNAm, por las siguientes evidencias (41): a) Tiene una alta afinidad por RNAs y no se une al RNAdc (57); b) su secuencia contiene motivos estructurales que se han encontrado en otras guanililtransferasas (49); c) se une covalentemente a GTP en una reacción reversible (66).

La proteína **VP4**, es una de las proteínas de la capa externa y es codificada por el segmento 4 de RNA. Es una proteína que tiene funciones importantes para que el virus infecte a las células huésped, como son la unión al receptor y la penetración a la célula,

además de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes.

El tratamiento proteolítico del virus con tripsina, resulta en el corte específico de VP4 en dos polipéptidos de menor peso molecular llamados VP8 (aa 1 al 231) y VP5 (aa 247 a 776) (3). El corte de VP4 no afecta la unión a la célula, pero ha sido asociado con la entrada del virus al citoplasma celular por una vía que se ha descrito como un posible tipo de penetración directa (35). El mecanismo por el cual el corte con tripsina incrementa la infectividad viral se desconoce: sin embargo, se ha propuesto que la penetración del virus puede ser iniciada por los extremos recién generados por el corte con tripsina (Fig. 3) o por un posible cambio conformacional de VP4 a consecuencia del corte con esta proteasa.

VP4 tiene varios dominios funcionales que se describen a continuación:

- a) Algunas cepas de rotavirus de origen animal tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos y esta aglutinación es mediada por la interacción de VP4 con el ácido siálico (AS) presente en la superficie de los eritrocitos. El dominio responsable de esta interacción se encuentra en el fragmento VP8 de VP4 (22) y las tirosinas en posiciones 155 y 188, y la serina en posición 190 juegan un papel esencial en esta interacción (14, 33).
- b) La proteína VP5 tiene la capacidad de unirse específicamente a la superficie de las células (69) y esta interacción se da con la integrina $\alpha 2\beta 1$, a través de la secuencia DGE presente en la posición 308-310 de VP5. Se ha propuesto que la VP5 pudiera interaccionar, además, con la integrina $\alpha 4\beta 1$ a través de la secuencia IDA y contiene al péptido KID que interacciona con la proteína hsc70

(13, 42).

La capa intermedia del virus está formada por la proteína **VP6**, la cual es la más abundante del virión, y está codificada por el gen 6. Es una proteína de 397 aa, que forma trímeros. Su importancia en el virión está dada debido a que interacciona tanto con la proteína VP2 hacia el interior de la partícula, como con VP4 y VP7 hacia el exterior, lo cual ayuda a mantener a la partícula viral ensamblada. Además de ser muy estable, VP6 contiene determinantes antigénicos o epítopes conservados entre las diferentes cepas de rotavirus, lo que la hace el principal blanco antigénico en los ensayos de diagnóstico inmunológico para rotavirus.

La proteína **VP7**, codificada por el segmento 7, 8 ó 9 de RNA, dependiendo de la cepa, consta de 326 aa y se modifica post-traduccionalmente por la adición de azúcares. Es una N-glicoproteína que contiene únicamente oligosacáridos del tipo de alta manosa. Es altamente inmunogénica e induce altos niveles de anticuerpos neutralizantes serotipo específicos. Se sabe que VP7 es glicosilada cotraduccionalmente a medida que se inserta en el lumen del retículo endoplásmico (RE) y la señal para esta inserción se encuentra en un péptido señal presente en el extremo amino de la proteína. La secuencia nucleotídica del gen que codifica para VP7 predice dos marcos de lectura abiertos en fase, uno al inicio y el segundo 30 nucleótidos río abajo. Ambos codones de inicio preceden regiones hidrofóbicas llamadas H1 y H2, que tienen el potencial de funcionar como péptidos señal para dirigir la síntesis de VP7 al RE. La proteína VP7 es retenida en la membrana del RE, sin embargo, no contiene la secuencia típica de

retención en RE (KDEL). Esta proteína contiene los dominios LDV y GRP, que han sido propuestos como los responsables de su interacción con las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha X\beta 2$, respectivamente, así como la región CNP que interactúa con la integrina $\alpha V\beta 3$ (Fig. 3) (17, 37, 42, 51).

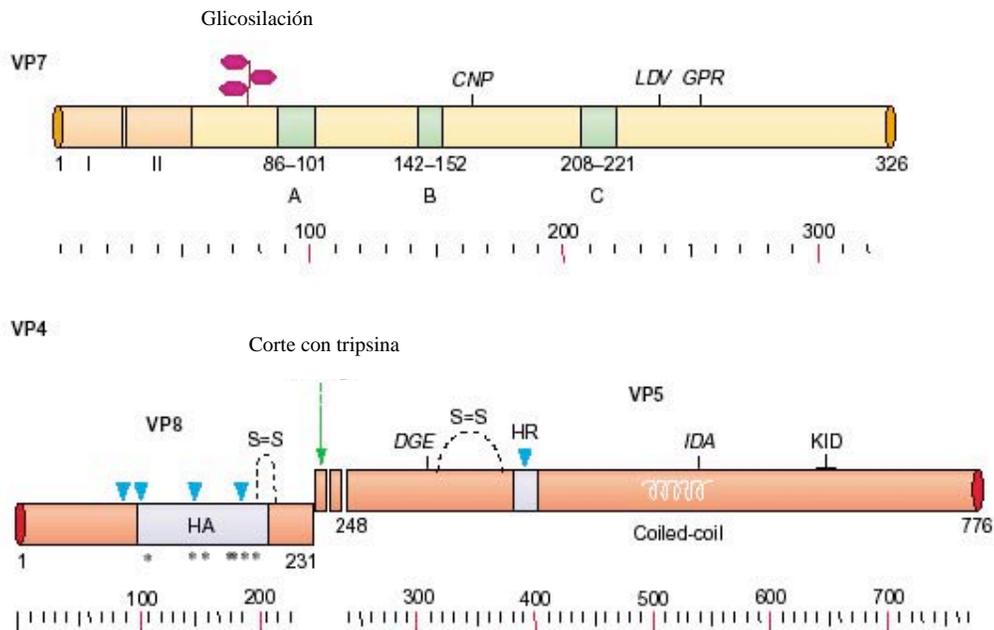


Fig 3. La proteína VP7 contiene los dominios LDV y GRP propuestos de interacción con las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha X\beta 2$, respectivamente. La región CNP interactúa con la integrina $\alpha V\beta 3$. En la proteína VP4 se muestra el corte por tripsina y las proteínas VP8 y VP5 resultantes. En la proteína VP8 se encuentra la región de unión a ácido siálico (HA). En VP5, se encuentran los dominios DGE e IDA de unión a las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$, respectivamente, y el péptido KID que interacciona con la proteína hsc70 (42) (Modificada de López y Arias, Trends in Microbiology, 2004) .

3.4.2 Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales de rotavirus, NSP1 a NSP6, son codificadas, dependiendo de la cepa, por los segmentos 5, 7, 8, 9, 10 y 11, respectivamente. Como su nombre lo indica estas proteínas no forman parte de la estructura del virión maduro.

Son sintetizadas en el citoplasma de la célula durante la infección y tienen funciones relacionadas con el control de la síntesis de proteínas celulares y virales; con la replicación del genoma; con el empaquetamiento de los genes virales y con la maduración de la partícula viral en el interior de la célula.

Una característica de los rotavirus es su capacidad para formar inclusiones citoplasmáticas electrodensas llamadas viroplasmos. En estas estructuras se encuentran acumuladas las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5, así como las proteínas virales VP1, VP2, VP3 y VP6 las cuales sirven para los pasos iniciales de la morfogénesis viral.

NSP2 es una proteína altamente conservada, codificada por el gen 8, que se localiza en viroplasmos. Esta proteína se asocia con la polimerasa viral VP1 en una infección normal y se autoensambla en octámeros. NSP2 tiene actividad de NTPasa dependiente de Mg^{+2} y actividad de helicasa independiente de Mg^{+2} (26, 59). Se une inespecíficamente a RNAs con gran afinidad y débilmente a RNAdc. NSP2 se ha asociado también a los intermediarios de replicación y se sugiere que puede funcionar como motor molecular que se une a RNAs viral y cataliza su empaquetamiento a través de la energía generada por su actividad de NTPasa (64). La interacción de la proteína NSP2 con la proteína NSP5, regula la hiperfosforilación de NSP5 y permite la formación de los viroplasmos en células infectadas (1).

La proteína **NSP5**, codificada por el segmento 11 de RNA, es una proteína de 198 aa y se caracteriza por un alto contenido de serina y treonina. Es una proteína O-glicosilada con un peso molecular de 21 a 22 kDa y puede variar desde 26 hasta 34 kDa dependiendo del grado de fosforilación (27). Se fosforila en su extremo C-terminal, lo cual es importante para la formación de homoligómeros y es importante para interactuar con NSP2. Se ha propuesto que el grado de fosforilación de NSP5 puede también contribuir al destino de los RNAm virales: si se encuentra hipofosforilada, se favorece la traducción y si se encuentra hiperfosforilada, el RNAm se dirige a viroplasmos donde se lleva a cabo la replicación del genoma (10). Se ha visto que NSP5 interactúa con NSP3 y con la polimerasa viral VP1 (26). En células infectadas, NSP5 es capaz de unirse inespecíficamente a RNAs y RNAdc, y se ha asociado con los intermediarios de replicación (1, 9). En células transfectadas con NSP2 y NSP5 se pueden visualizar estructuras parecidas a viroplasmos en ausencia de otras proteínas virales (2).

| Tabla 1 Características y asignamiento a los segmentos de RNAdc de las proteínas de rotavirus | | | | | | | | |
|---|----------------|---------------|-----|---|------------------------|----------------------|--|---|
| Segmento | Pares de bases | Proteína (aa) | kDa | Modificaciones postraduccionales | Agregados mol. Básicos | Distribución celular | Dominios estructurales | Propiedades / función |
| 1 | 3302 | VP1 (1088) | 125 | | | Viroplasma | | RNA polimerasa, unión al 3' UTR de los RNAm |
| 2 | 2690 | VP2 (881) | 94 | | Dímeros | Viroplasma | Unión a RNA | Pared del core, una RNACs, cofactor de VP1 |
| 3 | 2591 | VP3 (835) | 88 | | | Viroplasma | | Guanililtransferasa, una RNACs |
| 4 | 2362 | VP4 (776) | 88 | Corte en aa 231, 241 ó 247 produce: VP8 (28 kDa) VP5 (60 kDa) | Dímeros | Asociada al RE | Unión a ac. siálico, unión a receptor asialo, unión a integrinas | Espículas de capa externa, tropismo, hemaglutinación, unión a receptor, penetración |
| 5 | 1581 | NSP1 (491) | 53 | | | Citoplasma | Unión a RNA | Unión al 5' UTR de los RNAm, asociada al citoesqueleto |
| 6 | 1356 | VP6 (397) | 41 | Miristilación | Trímeros | Viroplasma | Trimerización interacción con VP2, VP4 y VP7 | Capa intermedia, esencial en transcripción |
| 7 | 1104 | NSP3 (315) | 34 | | Dímeros | Citoplasma | Unión a RNA, dimerización, unión a eIF4GI | Unión al 3' UTR de los RNAm interacción con eIF4GI, asociada al citoesqueleto, promueve la síntesis de las proteínas virales y la inhibición de síntesis de las |

| | | | | | | | | proteínas celulares |
|----|------|---------------|-------------------------|--|--|------------|---|--|
| 8 | 1059 | NSP2 (317) | 35 | Fosforilación | Multímeros 10S, que aumentan en tamaño al unir RNA | Viroplasma | | Une RNAs y dc, complejo con VP1 y NSP5, ensamblaje de viroplasma, estimula hiperfosforilación de NSP5, NTPasa |
| 9 | 1062 | VP7 (326) | 38 | Corte de péptido señal en aa 51, N- glicosilación (oligosacáridos de manosa) | Trímeros | RE | Retención en RE | Capa externa, altera la conformación de VP4, bloquea la translocación de los RNAs y la transcripción |
| 10 | 751 | NSP4 (175) | 28 | N-glicosilación (oligosacáridos de manosa) | | RE | Interacción con VP4 y VP6 | Receptor de DLPs en RE, enterotoxina |
| 11 | 667 | NSP5 (198) | 26, 28, 30- 34 | O-glicosilación (N- acetilglucosamina), fosforilación en Ser y Thr | Oligómeros | Viroplasma | Oligomerizaci ón, interacción con NSP2 y NSP6 | Complejo con NSP2 y NSP6, ensamblaje de viroplasma |
| | | NSP6 (92) | 11 | | | Viroplasma | | Complejo con NSP5 |

La longitud de los segmentos de RNAdc, las proteínas que codifican y el tamaño en aa, corresponden a la cepa SA11(17). Modificada de Estes, Virology, vol.2 1996.

3.5 Ciclo de Replicación

3.5.1 Entrada de los rotavirus a la célula

Los rotavirus tienen un tropismo muy específico, ya que infectan principalmente los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado. También se han identificado en órganos y líquidos fuera del intestino, sin embargo, no se conoce si en ellos causan enfermedad alguna (71). *In vitro*, se ha observado que los rotavirus son capaces de unirse a una gran variedad de líneas celulares; sin embargo, infectan eficientemente sólo células epiteliales de origen renal o intestinal y líneas celulares transformadas derivadas de hueso, pulmón, estómago e hígado (11). La mayoría de los estudios realizados sobre rotavirus, se realizan en células epiteliales de origen renal o intestinal. Un ejemplo de ellas son las células epiteliales de riñón de mono (MA104). Los rotavirus son capaces de unirse a la superficie celular a 4°C, pero para que el virus logre entrar a la célula, es necesario una temperatura permisiva de 37°C. Esto permite distinguir por lo menos dos pasos diferentes durante el inicio de la infección por rotavirus: la unión y la entrada. En estudios anteriores se observaron partículas virales sin genoma, llamadas VLP's (por virus-like particles), fluorescentes en la superficie celular después de una incubación a 4°C, y estas mismas no fueron visibles después de una incubación por 30 minutos a 37°C (8). Estas partículas VLP's fueron obtenidas por la expresión de las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7 en baculovirus con la proteína VP2 fusionada a GFP. La entrada de rotavirus en células MA104 parece ser un proceso

de varios pasos que involucra interacciones de la proteína VP4 y posiblemente VP7 con varias moléculas en la superficie celular (13, 42, 47).

El contacto inicial de algunas cepas de rotavirus con la superficie celular es mediado por la presencia de AS, ya que el tratamiento de las células con neuraminidasa, una enzima que corta el AS, evita que estas cepas se unan a la superficie de la célula impidiendo así la infección. Estas cepas se conocen como sensibles a neuraminidasa. Por otro lado, se ha observado que la mayoría de las cepas de rotavirus no requieren la unión a AS para infectar células en cultivo y son resistentes a neuraminidasa (42). Sin embargo, esto no implica que la unión a AS no sea importante *in vivo*, ya que se ha demostrado que esta interacción es necesaria para que exista una infección eficiente tanto *in vivo* como *in vitro* (46, 67). Así, varios glicoconjugados que contienen AS han sido propuestos como posibles receptores para los rotavirus. Tal es el caso de los gangliósidos GM3 en el intestino de cerdos recién nacidos, o GM1 en células LLC-MK2 (17). En general el AS se requiere para la unión a la superficie de las células huésped. Particularmente, la cepa aislada del mono rhesus, RRV, se une a receptores celulares que contienen AS, sensibles a neuraminidasa (44, 46).

Independientemente del tipo de interacción inicial del virus con la célula y de si es resistente o no al tratamiento con neuraminidasa, se ha observado que los rotavirus utilizan a las integrinas $\alpha v\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$ y a la proteína de choque térmico 70 (hsc70) como receptores post-unión (29, 68). Adicionalmente, se ha sugerido que durante la infección, pueden estar involucradas las integrinas $\alpha X\beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$ (13, 30). Las integrinas

son una familia de proteínas heterodiméricas compuestas por una subunidad α y una subunidad β , que se encuentran en la membrana celular y que participan en las interacciones de la célula con la matriz extracelular y en las interacciones célula-célula. La proteína VP4 es responsable de la unión del virus a la superficie celular y de las interacciones post-unión con las integrinas $\alpha2\beta1$, $\alpha4\beta1$ y la proteína hsc70. VP7 interacciona con las integrinas $\alphaV\beta3$ y $\alphaX\beta2$ en pasos posteriores a la unión (29). La localización de los sitios involucrados en interacciones entre las proteínas VP4 y VP7 de rotavirus y la interacción de éstas con las células se muestra en la figura 3.

La entrada de los rotavirus a la célula se da por un mecanismo no bien conocido. Los datos sugieren que los rotavirus no entran por endocitosis mediada por clatrina, ni mediada por caveolas (63). Como otra posibilidad se ha sugerido la penetración directa (35); sin embargo, este proceso no se ha descrito. Recientemente se ha descrito que la entrada de rotavirus probablemente utiliza dominios ricos en colesterol (lipid rafts) y requiere dinamina (34, 63), sugiriendo un tipo de endocitosis poco caracterizada.

3.5.2 Replicación de Rotavirus

La mayoría del conocimiento acerca del ciclo replicativo de los rotavirus se ha obtenido con estudios realizados en células MA104, en las que estos virus se replican muy eficientemente. Los rotavirus tienen un ciclo de replicación que se lleva a cabo por completo en el citoplasma celular. Al penetrar hacia el citoplasma, los rotavirus pierden la capa externa, quedando como DLP; sin embargo, no se sabe si esta pérdida se lleva

a cabo en la membrana celular o hasta que el virus se encuentra dentro de la célula (18). La pérdida de la capa externa activa la síntesis de los RNAm virales por medio de la acción concertada de la transcriptasa viral VP1 y la guanililtransferasa VP3. Estos RNAm virales salen a través del sistema de canales ubicados en los ejes de simetría del icosaedro hacia el citoplasma y sirven para sintetizar las proteínas virales y como templado para sintetizar el RNAdc que constituirá el genoma de la progenie viral (Fig.2) (39). La síntesis del RNAdc viral, el ensamble de los cores y las DLPs ocurre en inclusiones electrodensas llamadas viroplasmias que se forman en el citoplasma después de la infección (17).

La caracterización de partículas subvirales intracelulares indica que existen 3 tipos de intermediarios de replicación (RI) que contienen RNA viral en las células infectadas: a) el RI pre-core (que contiene las proteínas estructurales VP1, VP3 y RNAm); b) el RI core (que contiene las proteínas VP1, VP2, VP3, NSP2, NSP5 y RNAm); y c) el RI de doble capa (que contiene las proteínas VP1, VP2, VP3, VP6, NSP2, NSP5 y RNAm) (Fig. 4) (23, 58).

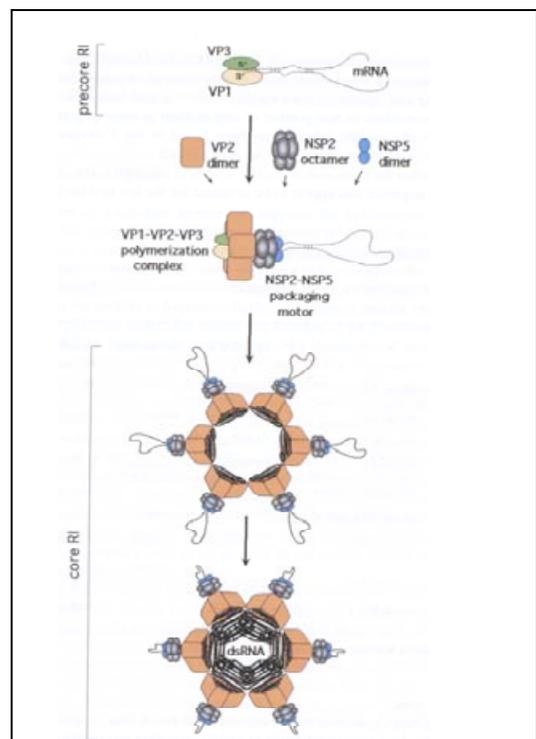


Fig. 4. Intermediarios formados durante la replicación del genoma de rotavirus. Tomada de Rotavirus genome replication: role of the RNA-binding proteins (58).

Dentro de los viroplasmos se ensamblan las DLPs, se lleva a cabo la replicación del RNA viral y se inicia la morfogénesis de la partícula viral. Una vez formadas las DLPs, interactúan con la proteína NSP4, la cual tiene al menos un dominio transmembranal. La proteína NSP4 funciona como receptor intracelular de las partículas de doble capa. Su interacción con VP6 y VP4 media la gemación de DLPs del viroplasma al RE y adquieren la tercera capa, formada por las proteínas VP4 y VP7 y una bicapa lipídica transitoria. Ya maduros, los virus son liberados de la célula por lisis (Fig. 5) (17, 18).

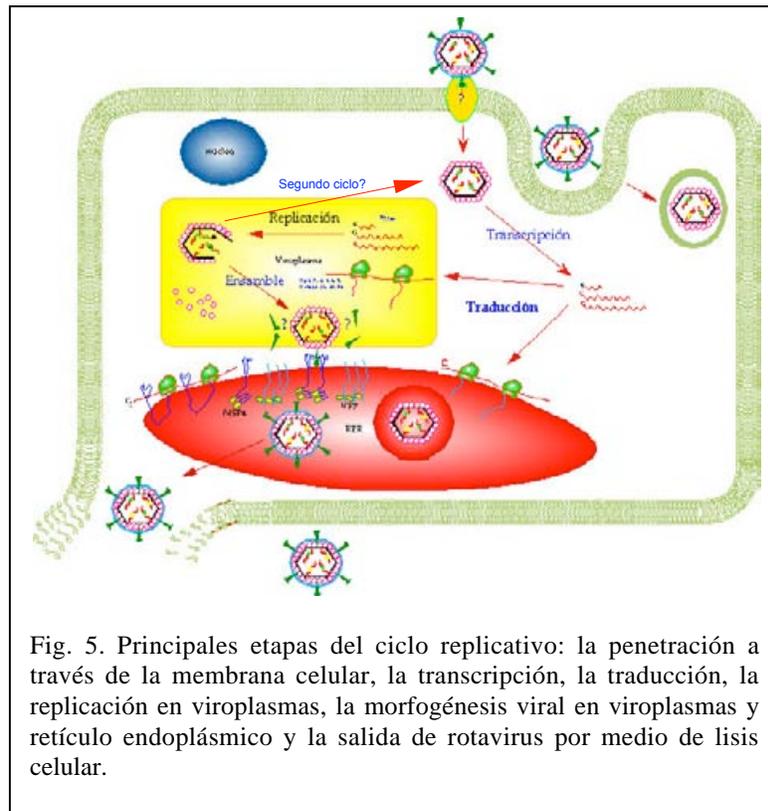


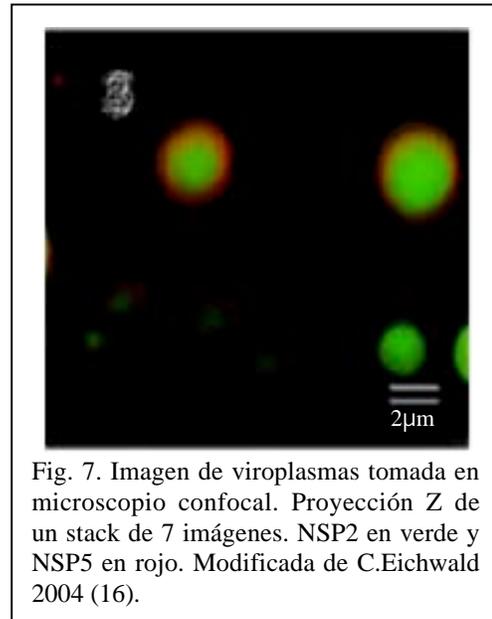
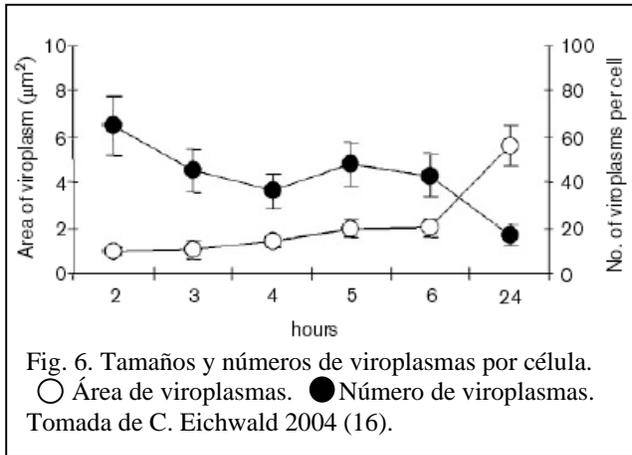
Fig. 5. Principales etapas del ciclo replicativo: la penetración a través de la membrana celular, la transcripción, la traducción, la replicación en viroplasmos, la morfogénesis viral en viroplasmos y retículo endoplásmico y la salida de rotavirus por medio de lisis celular.

3.5.3 Viroplasmos

Una vez que se acumula una masa crítica de proteínas virales sintetizadas *de novo* en las células infectadas, se forman viroplasmos y se ha propuesto que es en estas estructuras donde se ensamblan las partículas con dos capas (formadas por VP1, VP2, VP3 y VP6) y donde se lleva a cabo la replicación del RNA viral (17). Los viroplasmos pueden ser observados en el citoplasma celular por tinción con anticuerpos específicos contra cualquiera de las proteínas que están en viroplasmos, y específicamente las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5, ya que estas solas son capaces de formar viroplasmos (20). En estudios realizados transfectando a los genes que codifican para las proteínas NSP2 o NSP5 fusionadas a una proteína fluorescente (GFP) y coinfectando con rotavirus a una multiplicidad de infección (MOI) de 3, se han observado viroplasmos a partir de las 2 horas post-infección (hpi) (16). En el mismo estudio, se observó que los viroplasmos aumentaron su tamaño conforme transcurrió el tiempo de la infección, y debido a que el número de viroplasmos disminuyó conforme transcurrió el tiempo de la infección, los autores de este estudio sugirieron que el aumento de tamaño es por fusión de los viroplasmos iniciales (Fig. 6) (16).

La distribución de las proteínas NSP2 y NSP5 dentro del viroplasma es específica, ya que la proteína NSP2 se localiza en la parte interna y la proteína NSP5 se localiza en la parte externa, formando un anillo. En imágenes procesadas en tres dimensiones (Fig. 7), se observan los viroplasmos como estructuras esféricas (16). En estas estructuras se encuentran acumuladas, además de las proteínas NSP2 y NSP5, otras

proteínas virales como VP1, VP2, VP3 y VP6, las cuales son necesarias para los pasos iniciales de la morfogénesis viral.



Recientemente, se ha sugerido la posibilidad de que las partículas que salen de los viroplasm como partículas de doble capa, sean transcripcionalmente activas (17). De estas partículas, algunas migran al RE donde adquieren la tercera capa, mientras que otras permanecen en el citoplasma y sintetizan nuevos RNAm que pueden utilizarse como templado para traducción o una nueva ronda de replicación. A este proceso se le ha llamado “Segundo ciclo de replicación”.

4 Antecedentes

- El virus es capaz de unirse a la célula a 4 °C y penetrar a 37 °C.
- El virus interacciona con diferentes moléculas en la superficie celular.
- Los rotavirus interaccionan con los receptores de una manera secuencial, probablemente cambiando su estructura y se trasloque en la superficie.
- Durante la replicación, los rotavirus forman viroplasmias donde se lleva a cabo la replicación del RNA viral y el ensamble de la nueva progenie viral hasta DLPs.
- La visualización de virus unido a la célula, se ha logrado marcando virus con moléculas fluorescentes. En estudios anteriores se ha visto que es posible observar virus como poliomavirus, marcándolo con fluoróforo Oregon green y colocalizarlo con microtúbulos en cortes de células tomadas en microscopio confocal (25), reovirus conjugado con rodamina B o isotiocianato de fluoresceína ha sido observado en vesículas utilizando microscopio de epifluorescencia (24).
- Las VLP's de rotavirus con la proteína VP2 fusionada a GFP visualizadas en microscopio confocal, han servido para cuantificar la cantidad de moléculas marcadas en diferentes estructuras celulares en células vivas (15).

5 Objetivo General

- Caracterización morfológica de la infección por rotavirus.

5.1 Objetivos Particulares

- Estudiar la unión del virus a la célula por microscopía.
- Visualizar la formación de viroplasmias en el citoplasma celular y compararla con la síntesis de proteínas virales a distintos tiempos de la infección.
- Caracterización de la formación de viroplasmias dependiendo de la multiplicidad de infección.

6 Materiales y métodos

6.1 Células, virus y anticuerpos

Las células MA104 (epitelio de riñón de mono) se cultivaron en medio Advanced D-MEM suplementado con 3.0% de suero fetal bovino. La cepa de rotavirus de mono RRV se obtuvo de H.B. Greenberg, Stanford, California. Anticuerpos policlonales de conejo anti-NSP2, anti-NSP5 (27) y 474 anti-VP5 (específico contra la región de los aa 474 a 776 de la proteína VP4 de la cepa RRV); anticuerpos monoclonales de ratón 4B5 (40), Y 255/60 anti-VP6 (28); 4F8 anti-VP7 (específico contra la proteína VP7 de la cepa RRV); y HS2 anti-VP4 (53) fueron obtenidos en el laboratorio. El anticuerpo monoclonal anti-integrina $\alpha 2$ (clona AK7) fue obtenido de Chemicon, anticuerpos conjugados secundarios de cabra anti-conejo IgG y de cabra anti-ratón IgG acoplados a Alexa 488 y 568, Texas Red-X succinimidil ester y toxina de cólera (CTB) acoplada a Alexa 488 fueron obtenidos de Molecular Probes. Proteína A peroxidasa, y anticuerpo de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa fueron obtenidos de Zymed.

6.2 Producción y purificación de virus

El virus RRV, previamente activado con tripsina a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, se creció en cultivos de células MA104 confluentes. La infección se llevó a cabo con una multiplicidad de infección (MOI) de 3 unidades formadoras de focos (ffu) por célula, se incubó a 37°C y se cosechó el lisado aproximadamente 20 hpi. Se le agregó cloruro de

calcio a una concentración final 5 mM y bicarbonato de sodio para alcalinizar el medio. Para purificar el virus, el lisado se centrifugó por 90 minutos a 100,000 g. La pastilla obtenida se resuspendió en buffer TNC [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂], y se homogeneizó con el equipo Polytron, mantenido en hielo. Al la pastilla homogeneizada se agregó un volumen igual de freón frío para quitar restos celulares. Se homogeneizó en vórtex y se centrifugó a 4,000 g por 5 minutos, seguido de varios lavados con TNC y se recolectó el sobrenadante. Al sobrenadante se le agregó cloruro de cesio (CsCl) para obtener una densidad final de 1.36 g/ml, se homogeneizó y centrifugó a 150,000 g por 18 hrs para formar un gradiente de densidad. Debido a que las partículas virales tienen diferentes densidades, este gradiente nos permite separar las TLPs que tienen una densidad de 1.36 g/cm³, de las DLPs que tienen una densidad de 1.38 g/cm³ y las nucleocápsides de 1.44 g/cm³ (4). Las TLPs y DLPs se colectaron por punción y posteriormente se eliminó el CsCl, con el que se formó el gradiente, por un proceso denominado de “desalado”. Para desalar se agregó un volumen aproximado de 500 µl de TLPs o DLPs en un tubo de ultracentrifuga y se llenó con PBS Ca²⁺ (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄, 0.9 mM CaCl₂); se centrifugó a 200,000 g por 30 minutos; se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en PBS Ca²⁺, se centrifugó una vez más, se resuspendió en un volumen de 300 µl de PBS Ca²⁺ y se dejó por una noche a 4°C. Posteriormente las muestras se sonicaron 3 veces por 5 segundos para homogeneizar el virus purificado y centrifugado.

6.3 Titulación de virus

El virus se tituló en células MA104 crecidas en cajas de 96 pozos para cultivo. Las células se lavaron dos veces con Medio Esencial Mínimo (MEM) sin suero. En una caja dilutora de 96 pozos se hicieron diluciones del virus en MEM sin suero y con éstas se inocularon las células y se dejó adsorber por 1 hr a 37 °C. El virus no adsorbido fue retirado y las células se lavaron con MEM 2 veces y se incubó por 14 hrs a 37°C. Finalmente se lavaron las células con PBS, se fijaron con acetona al 80% en PBS por 15 minutos y se hizo una inmunotinción con un anticuerpo policlonal anti-rotavirus por 1 hr. Se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con proteína A peroxidasa por 2 hrs. Se lavaron dos veces con PBS y se les agregó sustrato de peroxidasa, carbazol y peróxido de hidrógeno filtrado, hasta ver la aparición de los focos de infección. Se lavó con agua para detener la reacción. Las células infectadas fueron contadas en un microscopio Invertido Nikon Diaphot 300 semi-automático provisto de una cámara COHU color CCD y software Visiolab 1000 y se determinó el título viral del lisado, que es el número de ffu que hay por ml de lisado.

6.4 Purificación de anticuerpos

Los anticuerpos policlonales específicos para las proteínas NSP2 y NSP5 fueron obtenidos y purificados de suero de conejo previamente inmunizados con proteínas específicas. Para purificarlos, el anticuerpo se clarificó en una columna de fibra de vidrio y se dializó contra PBS en agitación a 4 °C por 2 hrs. Después de la diálisis se

centrifugó a 16,000 g por 5 minutos y el sobrenadante se dejó en agitación toda la noche en cuarto frío con proteína A acoplada a sefarosa. Después de la incubación, se centrifugó a 850 g por 2 minutos, el sobrenadante se retiró y la proteína A sefarosa con los anticuerpos unidos se lavó 5 veces con 10 ml de PBS centrifugando a 850 g por 2 minutos. La proteína A sefarosa se colocó en jeringas de insulina, en las que fue previamente colocado un tapón de papel filtro en el fondo. Los anticuerpos se extrajeron con ácido cítrico 100 mM pH 4.52 por la columna y las fracciones se recolectaron en tubos con 50 μ l de Tris pH 8.8 con volúmenes de 0.5 ml del filtrado aproximadamente. Las fracciones que contenían anticuerpo se determinaron por gel y las fracciones positivas se dializaron nuevamente contra PBS.

6.5 Visualización de viroplasmias por inmunofluorescencia

Las células MA104 crecidas sobre cubreobjetos en cajas de 12 ó 24 pozos, se lavaron 2 veces con MEM sin suero y se infectaron con virus RRV a la MOI deseada durante 1 hr a 4 °C. Después de la adsorción, el virus no unido se lavó con MEM sin suero y la infección se dejó proceder durante el tiempo deseado. Posteriormente, las células se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS durante 15 minutos, seguido de otros 4 lavados con solución de lavado (PBS-50 mM NH_4Cl) por 5 minutos. La membrana celular se permeabilizó con triton X-100 (TX 100) al 0.5% en PBS-1% BSA-50 mM NH_4Cl por 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de 4 lavados con solución de lavado. Después de lavar, se agregó el anticuerpo primario deseado en PBS-1% BSA- NH_4Cl y se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente. Después de

otros 4 lavados con solución de lavado, se agregó el anticuerpo secundario acoplado con Alexa 488 o 568 4 µg/ml en PBS-1% BSA-50 mM NH₄Cl y se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente. Se lavó 4 veces con solución de lavado y se montó sobre un portaobjetos colocando una gota de medio de montaje Fluoprep sobre el portaobjetos, el cubreobjetos se colocó del lado que presentó células encima de la gota de Fluoprep. Se analizó en microscopio de fluorescencia Axioskop mot plus, Zeiss y software Image Pro Plus 5.0.2.9 y Adobe Photoshop 7.0.

6.6 Marcaje del virus purificado con Texas Red

Se utilizaron DLPs y TLPs purificadas y desaladas por centrifugación. Las TLPs, se activaron previamente con tripsina 1% a una concentración final de 10µg/ml por 30 minutos a 37°C. Las DLPs se trataron con EDTA 10 mM por una hr para eliminar las TLPs que pudieran estar presentes. Posteriormente, el pH de las muestras se ajustó a 8.3 con una solución 100 mM de NaHCO₃. Se preparó una dilución de Texas Red en PBS Ca⁺², se agregó a la muestra con el virus y se incubó por 1 hr a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detuvo con Tris pH 8.8 a una concentración final 50 mM. Las muestras se protegieron de la luz y se guardaron a 4°C hasta su uso. Para asegurar que el virus quedó marcado, se observó en el microscopio contrastando con esferas de látex de 100 nm de diámetro acopladas a alexa 488. Las muestras se titularon como se menciona anteriormente para verificar que no se disminuyó la infectividad comparándolo con virus control tratado de la misma manera pero sin

fluoróforo. Para identificar el marcaje de las proteínas virales, éstas se separaron por electroforesis en poliacrilamida-SDS, y se observaron en un equipo Typhoon Trio.

6.7 Unión de virus a la membrana celular

Las células MA104 se crecieron sobre cubreobjetos en cajas de 12 ó 24 pozos, posteriormente se lavaron 2 veces con MEM sin suero y se dejaron bloqueando con MEM sin suero con 1% BSA a 37°C por 1 hr. Se retiró la solución bloqueadora y se dejó unir el virus (TLPs y DLPs) marcado, previamente centrifugado en PBS Ca⁺² para eliminar el fluoróforo libre, diluido en MEM sin suero con 1% BSA por 1 hr a 4°C. Después de la adsorción, el virus que no se unió se lavó 4 veces con MEM sin suero con 0.5% BSA a 4°C y se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS durante 15 minutos, o con etanol absoluto a -20°C por 10 minutos. Una vez fijadas las muestras, se tiñeron membranas con toxina de cólera acoplada a Alexa 488 en dilución 1:2000, o anticuerpo α -integrina alfa-2 (clona AK2) en concentración 10 μ g/ml y anticuerpo secundario α -ratón Alexa 488. Se utilizó también un marcador de lípidos DilC18 en dilución 1:75,000, el cual se usó junto con el virus antes de fijar. Se lavaron 4 veces con solución de lavado y se montaron sobre portaobjetos como ya se mencionó anteriormente. Las muestras se observaron en microscopio confocal LSM 510 marca Zeiss y se analizaron mediante el software Image J 1.32j y Adobe Photoshop 7.0. En estas imágenes se refiere un corte superior a la parte apical de la célula, un corte medio al centro de la célula mostrando citoplasma y membrana periférica; y proyección al empalme de todos los cortes obtenidos.

6.8 Seguimiento del virus durante la entrada

Las células MA104 se crecieron sobre cubreobjetos en cajas de 12 ó 24 pozos, posteriormente se lavaron 2 veces con MEM sin suero y se dejaron bloqueando con MEM sin suero con 1% BSA a 37°C por 1 hr. Se retiró la solución bloqueadora y se dejó unir el virus (TLPs y DLPs) marcado, previamente centrifugado en PBS Ca^{+2} para eliminar el fluoróforo libre, diluido en MEM sin suero con 1% BSA por 1 hr a 4°C. Después de la adsorción, el virus que no se unió se lavó con MEM sin suero con 0.5% BSA y se dejó proceder la infección a 37 °C por 30 minutos. Se lavó 4 veces con MEM sin suero con 0.5% BSA y se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS durante 15 minutos. Una vez fijadas las muestras, se tiñeron membranas con toxina de cólera acoplada a Alexa 488 en dilución 1:2000. Se lavaron 4 veces con solución de lavado y se montaron sobre portaobjetos como se mencionó anteriormente. Las muestras se observaron en microscopio confocal LSM 510 marca Zeiss y se analizaron mediante el software Image J 1.32j y Adobe Photoshop 7.0.

6.9 Métodos Estadísticos

Para realizar el análisis de los datos obtenidos, se utilizaron herramientas estadísticas entre las que se incluye el software GraphPad Prism Versión 4.0a, Microsoft Excel, análisis de t-Student e histogramas.

7 Resultados

7.1 Visualización de virus unido a la superficie celular

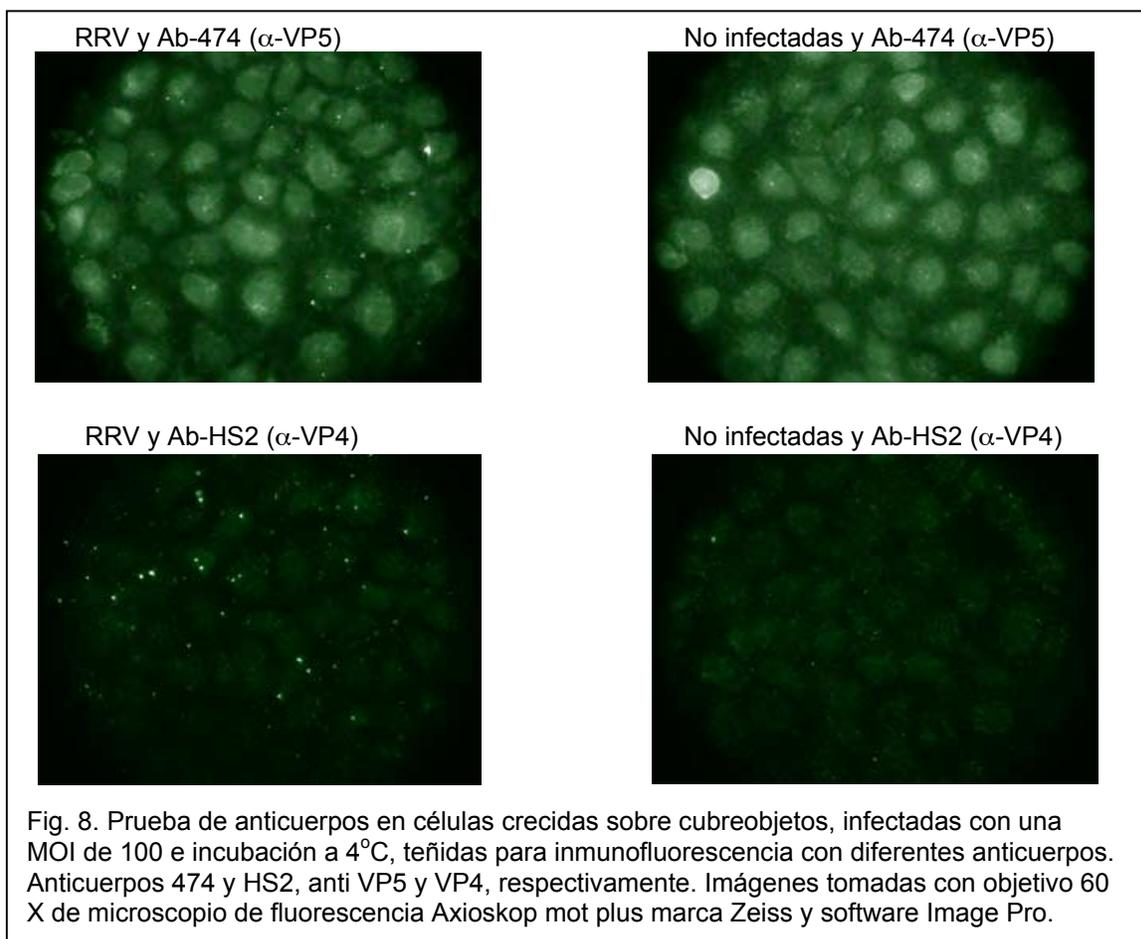
7.1.1 Ensayos de fluorescencia con anticuerpos contra proteínas estructurales del virus

Para observar el virus unido a la superficie celular, primeramente se probaron diferentes anticuerpos contra las proteínas estructurales del virus VP4, VP6 y VP7. Se utilizaron células MA104 infectadas con la cepa RRV utilizando una MOI de 3.5 y fijadas a 8 hpi. Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos monoclonales 4B5, y 255/60 anti-VP6; 4F8 anti-VP7; HS2 anti-VP4 y 474 anti-VP5. Los anticuerpos 4B5, 255/60 ambos anti-VP6, HS2 anti-VP4 y 474 anti-VP5, presentaron una buena señal en células infectadas (datos no mostrados).

7.1.2 Visualización de virus en la superficie por inmunotinción con anticuerpos

Como primer objetivo intentamos visualizar el virus unido a la célula. Para esto, se utilizaron células MA104 crecidas en cubreobjetos sobre las cuales se dejó unir virus purificado de la cepa RRV a una MOI aproximada de 100 a 4°C por 90 minutos. Posteriormente fueron fijadas y se realizó una inmunotinción como se describe en materiales y métodos utilizando los anticuerpos 474 anti-VP5 y HS2 anti-VP4 y anticuerpos secundarios acoplados a alexa 488. Con las imágenes obtenidas (Fig. 8),

no fue posible distinguir el virus unido a la célula, debido a que en células control, sin virus unido, también se presenta una señal parecida. Debido a esto intentamos visualizar el virus directamente acoplado al fluoróforo.



7.1.3 Marcaje directo de la cepa RRV con fluoróforo

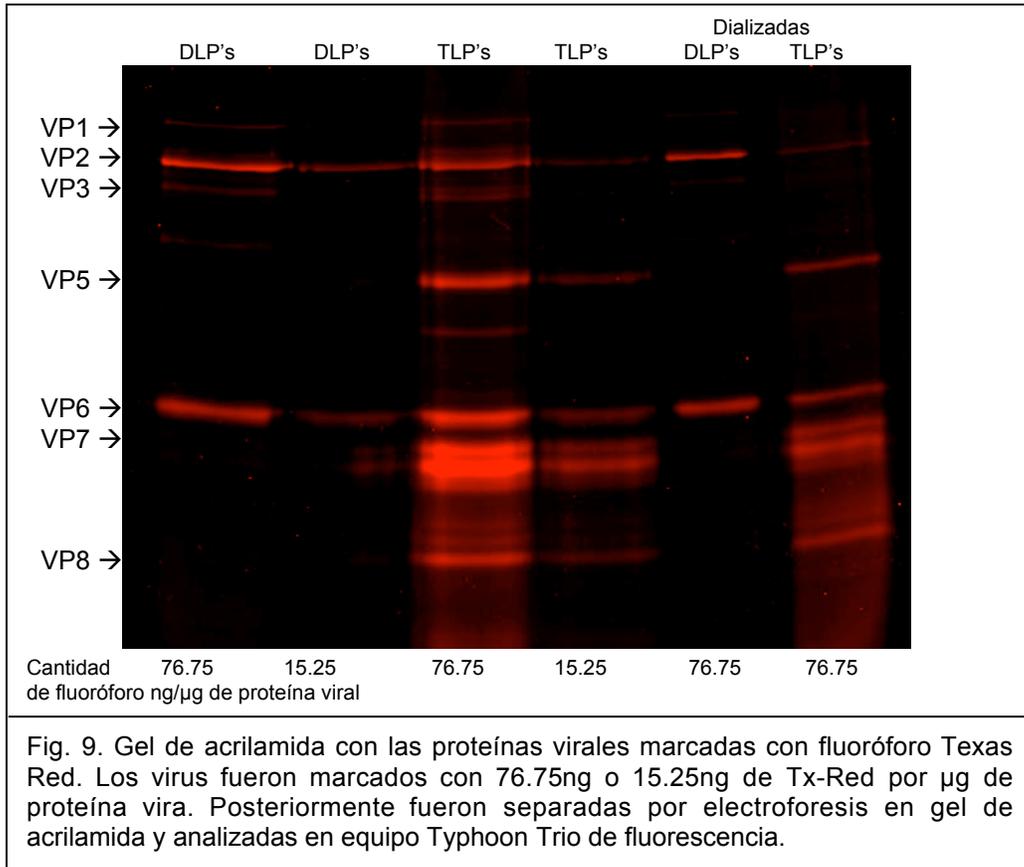
Para visualizar el virus unido a la célula a través de marcaje directo con fluoróforos, primero tuvimos que probar el nivel de marcaje del virus y su infectividad. Por esta razón, hicimos pruebas para acoplar cantidades fijas de TLPs purificadas de la cepa RRV con diferentes cantidades de fluoróforo (76.75ng y 15.25ng por μ g de proteína

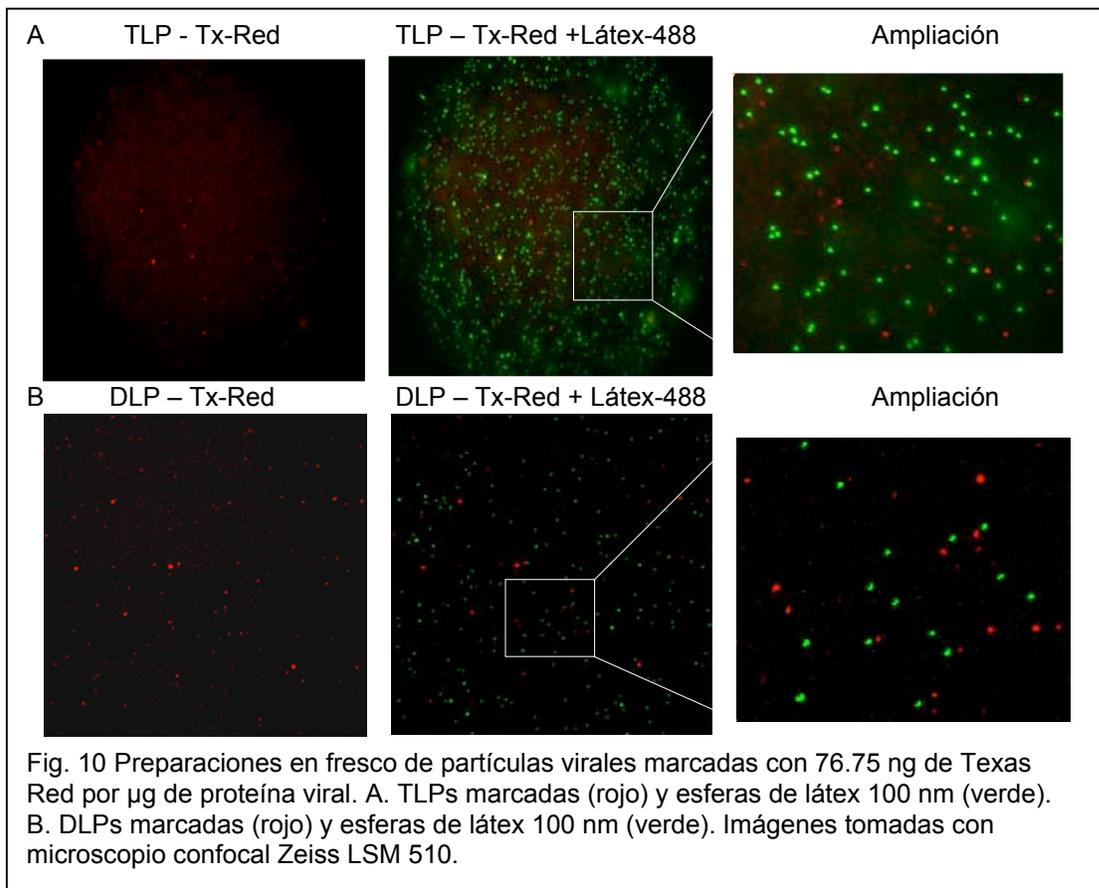
viral). Después de marcar el virus, se realizó una titulación en placa de 96 pozos para comparar la infectividad del virus marcado con el control, virus incubado con DMSO solamente (diluyente de fluoróforo), y así asegurar que el virus que teníamos marcado no había perdido su infectividad. Se observó que la capacidad de infectar del virus marcado con 76.75 ng, disminuyó casi al 50% (5.845×10^6), mientras que el virus marcado con 15.25 ng mantuvo su infectividad (1.176×10^7) (Tabla 2). Posteriormente, se realizó una separación de las proteínas (del virus marcado) por electroforesis en poliacrilamida-SDS y se reveló en un equipo de fluorescencia Typhoon para visualizar las proteínas virales marcadas (Fig. 9). Se observó que el virus marcado con 76.75 ng de fluoróforo presentaba un marcaje mayor que con 15.25 ng. En este gel, se observaron las proteínas VP1, VP2, VP5, VP6, VP7 y VP8 marcadas en las muestras de TLPs y las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP6 en las muestras de DLPs. Este virus marcado con 15.25 ng se dializó contra PBS Ca²⁺ por 3 hrs y se realizó la detección tanto de DLPs como de TLPs con esferas de látex de 100 nm acopladas a alexa 488 las cuales se observaron al microscopio para asegurar que era posible ver dichas partículas y comparar el tamaño del virus marcado con las esferas (Fig. 10).

Tabla 2

| Cantidad de TX Red / μ g de proteína | Titulo viral | Porcentaje de infectividad |
|--|---------------------|----------------------------|
| Control DMSO | 1.087×10^7 | 100% |
| 76.75 ng | 5.845×10^6 | 53.77% |
| 15.25 ng | 1.176×10^7 | 108.18% |

Con base en estos resultados se eligió marcar cada microgramo de virus con 15.25 ng de fluoróforo para futuros ensayos.





7.1.4 Unión del virus fluoresceinado a las células

El siguiente paso fue la visualización del virus fluoresceinado unido a la superficie de las células. Para esto utilizamos células MA104 crecidas sobre cubreobjetos, las cuales fueron lavadas 2 veces con MEM sin suero e incubadas con el virus marcado por 1 hr a 4°C para permitir sólo su unión. Una vez transcurrido este tiempo, las células se lavaron, se fijaron y se realizó una inmunotinción con toxina de cólera acoplada a Alexa 488, la cual se une con gangliósidos GM1 presentes en la membrana celular. Las preparaciones se analizaron en microscopio confocal, adquiriendo imágenes de cortes de aproximadamente $0.5 \mu\text{m}$. En estas imágenes se pudo observar el virus localizado

en el mismo plano de la toxina de cólera, lo que sugiere que el virus se encuentra en la membrana de la célula (Fig. 11). De la misma manera se realizó el ensayo tiñendo la membrana con un anticuerpo anti-integrina $\alpha 2$ (AK7), obteniendo el mismo resultado, en el cual se observó el virus en la membrana de la célula (Fig. 12). Como control negativo, se utilizaron DLPs marcadas de la misma manera que las TLPs. En estas preparaciones no se observó la unión de las partículas DLPs a la superficie de las células (Fig. 11 y 12).

7.2 Seguimiento del virus en sus primeras etapas de la entrada

De la misma manera que el ensayo para virus marcado unido a la célula, se utilizaron células MA104 crecidas sobre cubreobjetos incubadas con virus fluoresceinado a 4°C por 1 hr para permitir sólo la unión a la superficie y posteriormente la temperatura se cambió a 37°C por 30 minutos para tratar de observar el cambio de localización del virus en la membrana, la cual fue teñida con toxina de cólera acoplada a Alexa 488. En estas pruebas se logró observar que los virus que inicialmente se encuentran localizados en la membrana (incubación a 4°C solamente), después de la incubación a 37°C por 30 minutos no se encuentran localizados en la membrana, lo cual sugiere que el virus, durante este tiempo de penetra a la célula (Fig. 13).

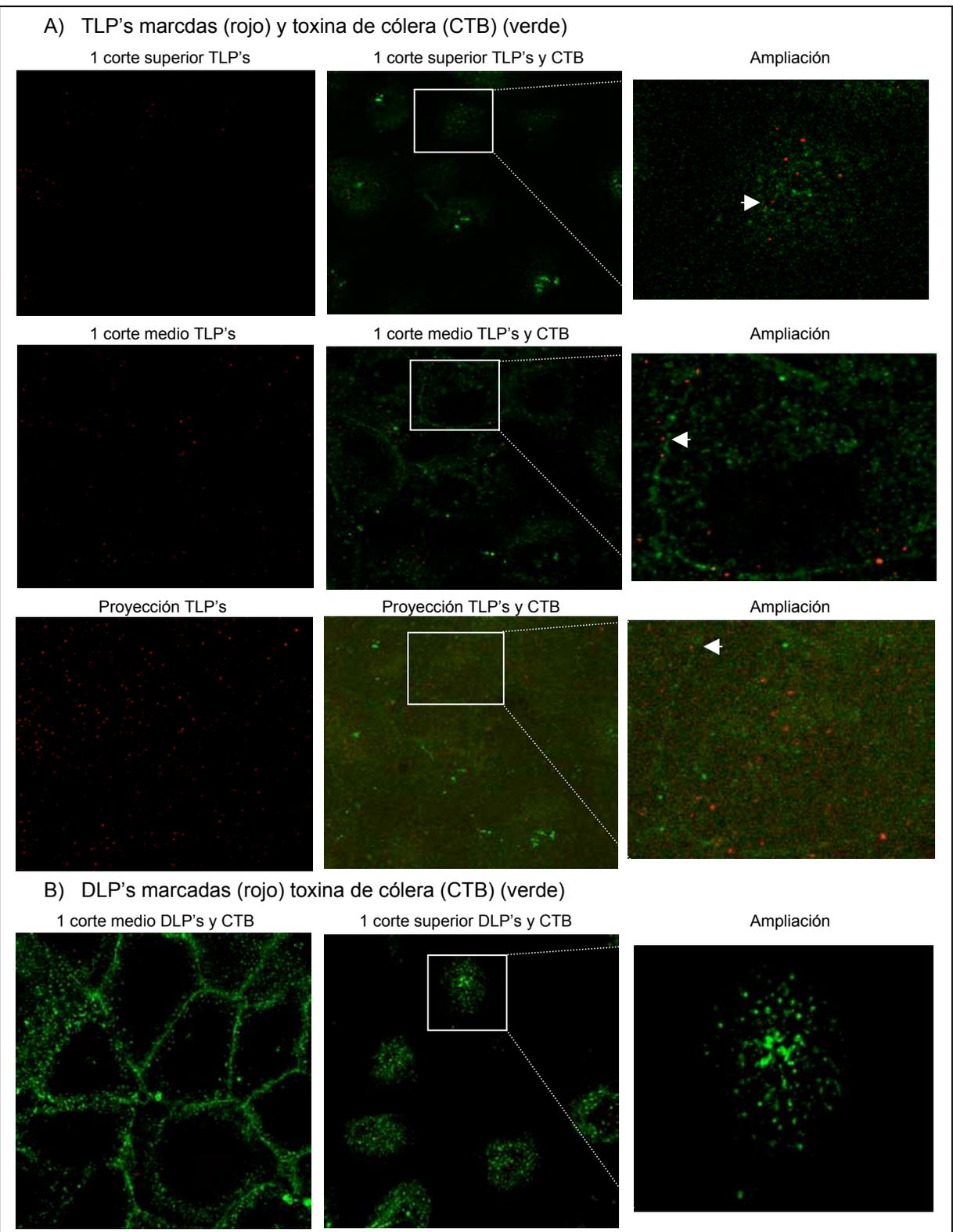


Fig. 11. Observación de partículas virales marcadas con fluoróforo Texas-Red, unidas a células crecidas sobre cubreobjetos. Virus marcado incubado a 4°C, y tinción para inmunofluorescencia. A. TLP's marcadas (rojo) y toxina de cólera (CTB) (verde). B. DLP's marcadas (rojo) y CTB (verde). Imágenes tomadas en cortes de aproximadamente 0.5 µm de espesor, con microscopio confocal Zeiss LSM 510. Las flechas señalan TLPs marcadas.

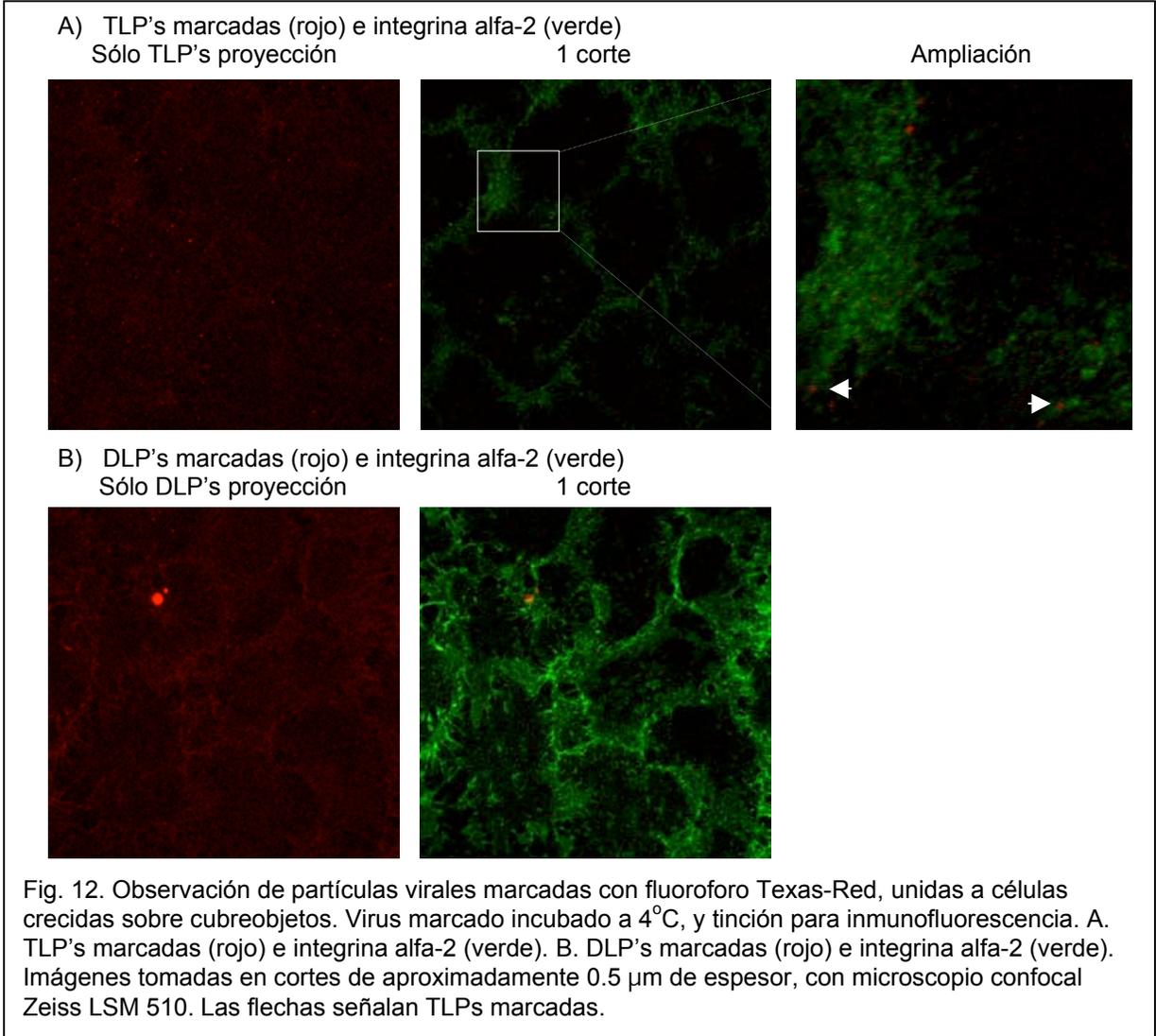
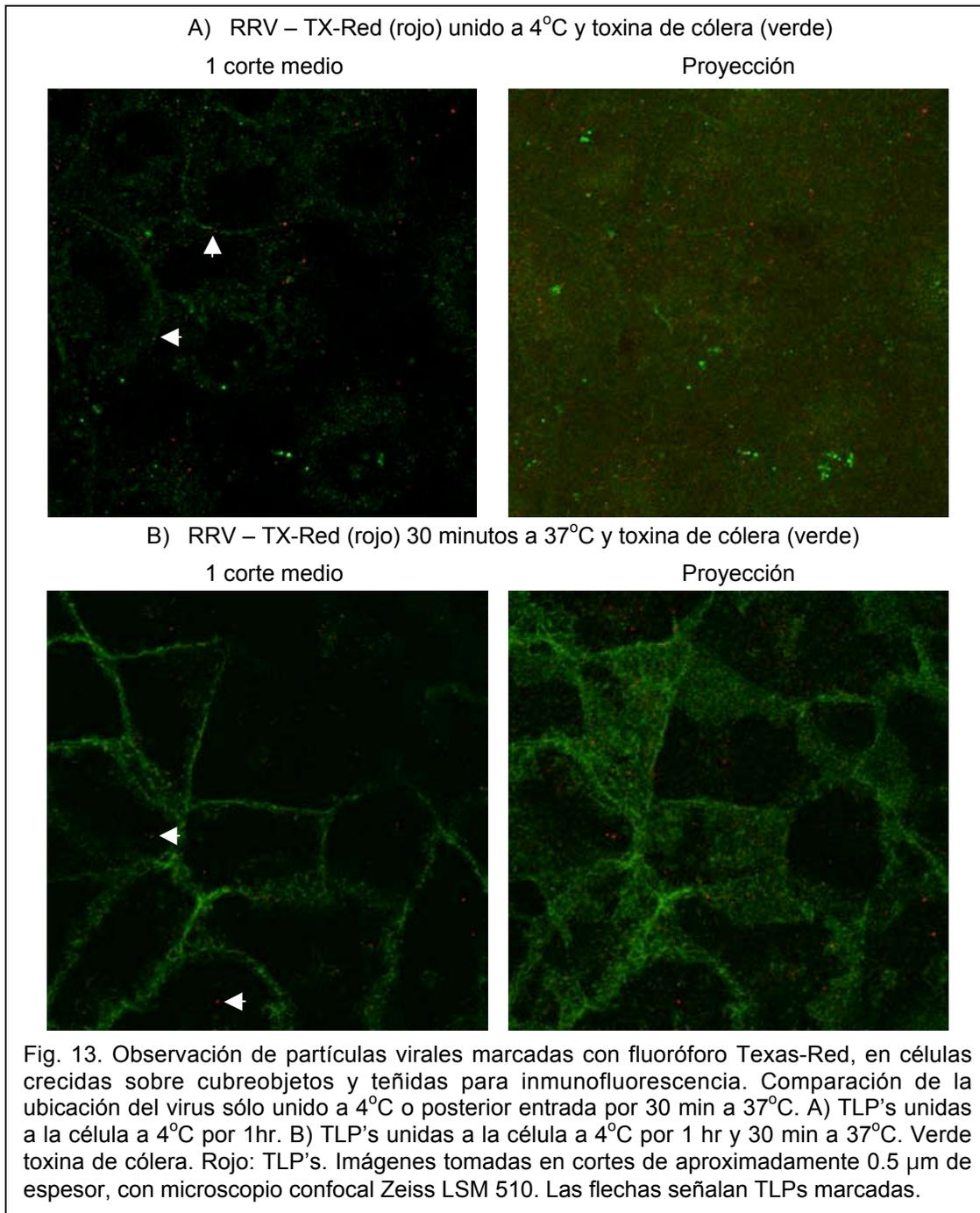


Fig. 12. Observación de partículas virales marcadas con fluoroforo Texas-Red, unidas a células crecidas sobre cubreobjetos. Virus marcado incubado a 4°C, y tinción para inmunofluorescencia. A. TLP's marcadas (rojo) e integrina alfa-2 (verde). B. DLP's marcadas (rojo) e integrina alfa-2 (verde). Imágenes tomadas en cortes de aproximadamente 0.5 µm de espesor, con microscopio confocal Zeiss LSM 510. Las flechas señalan TLPs marcadas.



7.3 Caracterización de anticuerpos contra proteínas específicas de viroplasmos

Como se había descrito anteriormente, los viroplasmos pueden ser observados en el citoplasma por tinción con anticuerpos específicos contra las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5. Debido a que uno de nuestros objetivos de estudio son los viroplasmos, decidimos probar los anticuerpos existentes en el laboratorio contra las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5, las cuales son específicas de viroplasmos, y así evaluar su eficiencia en ensayos de inmunofluorescencia. Las tinciones fueron realizadas en cultivos de células MA104 infectadas con la cepa RRV a 8 hpi. Los anticuerpos α -NSP2 y α -NSP5 dieron señal a diluciones de 1:100 hasta 1:600 y el anticuerpo α -conejo Alexa 488 y 568 en diluciones 1:200 hasta 1:600. La mejor señal la presentó el anticuerpo α -NSP2 (Fig. 14). Con estos resultados, se concluyó utilizar el anticuerpo α -NSP2 en dilución 1:200 (1.15 μ g/ml) y el anticuerpo α -conejo Alexa 488 en dilución 1:500 (4 μ g/ml), debido a que en células infectadas y teñidas en estas condiciones, se logró ver claramente los viroplasmos, mientras que en células control, no infectadas, no se observó señal.

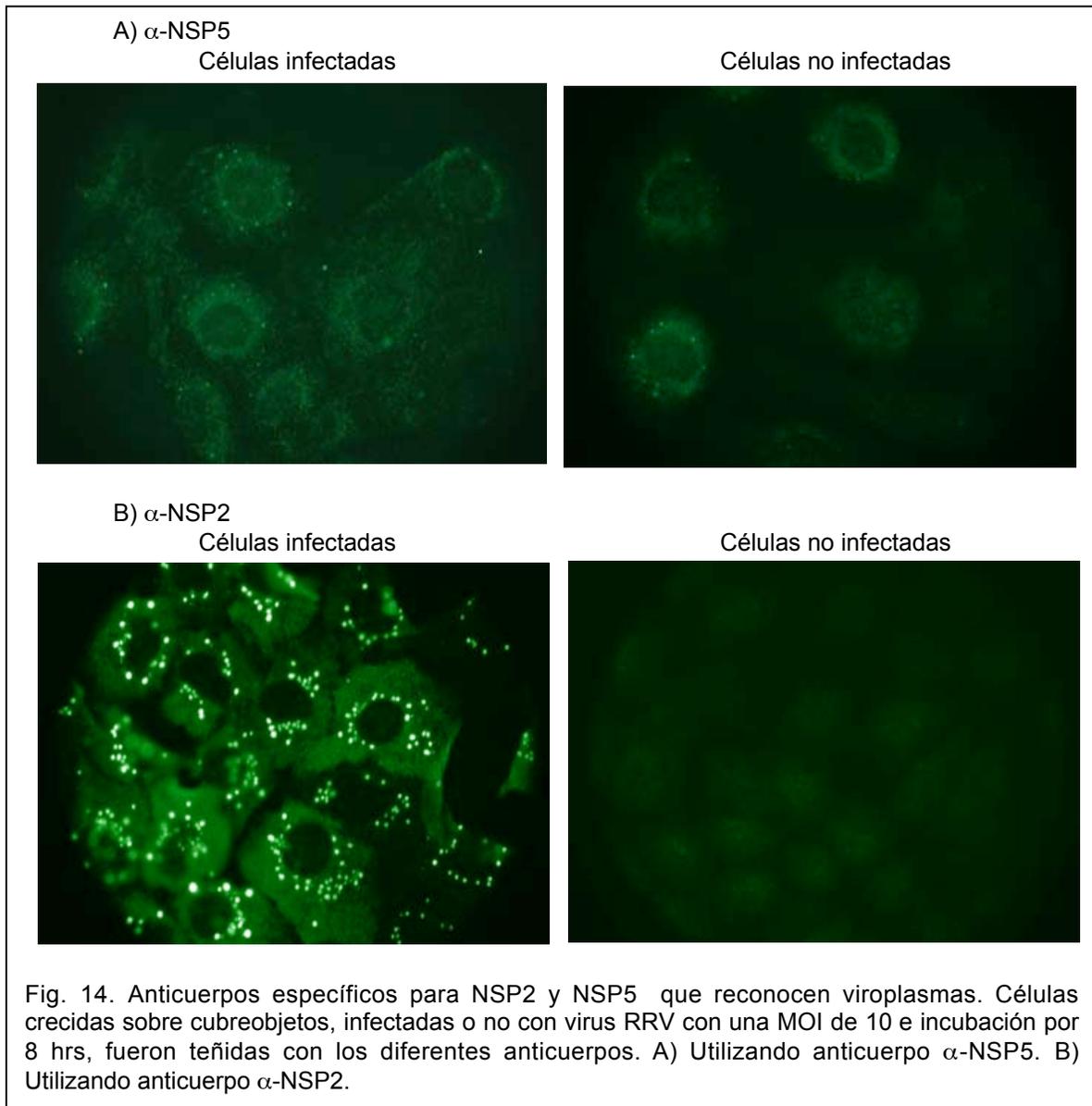


Fig. 14. Anticuerpos específicos para NSP2 y NSP5 que reconocen viroplasmata. Células crecidas sobre cubreobjetos, infectadas o no con virus RRV con una MOI de 10 e incubación por 8 hrs, fueron teñidas con los diferentes anticuerpos. A) Utilizando anticuerpo α -NSP5. B) Utilizando anticuerpo α -NSP2.

7.4 Caracterización de la cinética de formación de viroplasmas en células MA104 infectadas con la cepa RRV.

Para caracterizar la cinética que sigue la formación de viroplasmas en el citoplasma celular, células MA104 crecidas sobre cubreobjetos fueron infectadas con la cepa RRV a una MOI de 0.1, 0.5, 2.5 y 10 y fijadas a distintos tiempos post-infección (2, 4, 6 y 8 hrs). Los viroplasmas fueron detectados con anticuerpo anti-NSP2. En total, para cada condición (4 diferentes MOI y 4 tiempos diferentes), se analizaron 400 células (Fig. 15). Se observó en cada MOI que el número de viroplasmas por célula aumentó con el tiempo post-infección (Fig. 16). También se ha observado que con el aumento de la MOI el número de viroplasmas por célula se aumenta a los distintos tiempos post-infección. En estas gráficas, la pendiente de la recta obtenida corresponde a la velocidad con que aumenta el número de viroplasmas respecto al tiempo. Observando el aumento que existe entre un tiempo y otro en una misma MOI (Fig. 17), se encontró que en las MOI's 0.1, 0.5 y 10, se observó un aumento considerable de las 4 a las 6 hpi, con excepción de la MOI 2.5, mientras que entre otros puntos del experimento no se observó este aumento. Estos datos sugieren que entre las 4 y las 6 hpi se podría iniciar un segundo ciclo de replicación.

Se realizó un análisis estadístico de t-Student, en el cual se compararon los promedios de cada multiplicidad a los diferentes tiempos y cada tiempo a las diferentes multiplicidades obteniendo que los promedios son significativamente diferentes, con un nivel de 95% de confianza ($p < 0.05$), asegurando así que existe diferencia entre las

diferentes MOI utilizadas, y entre los diferentes tiempos estudiados dentro de una misma MOI.

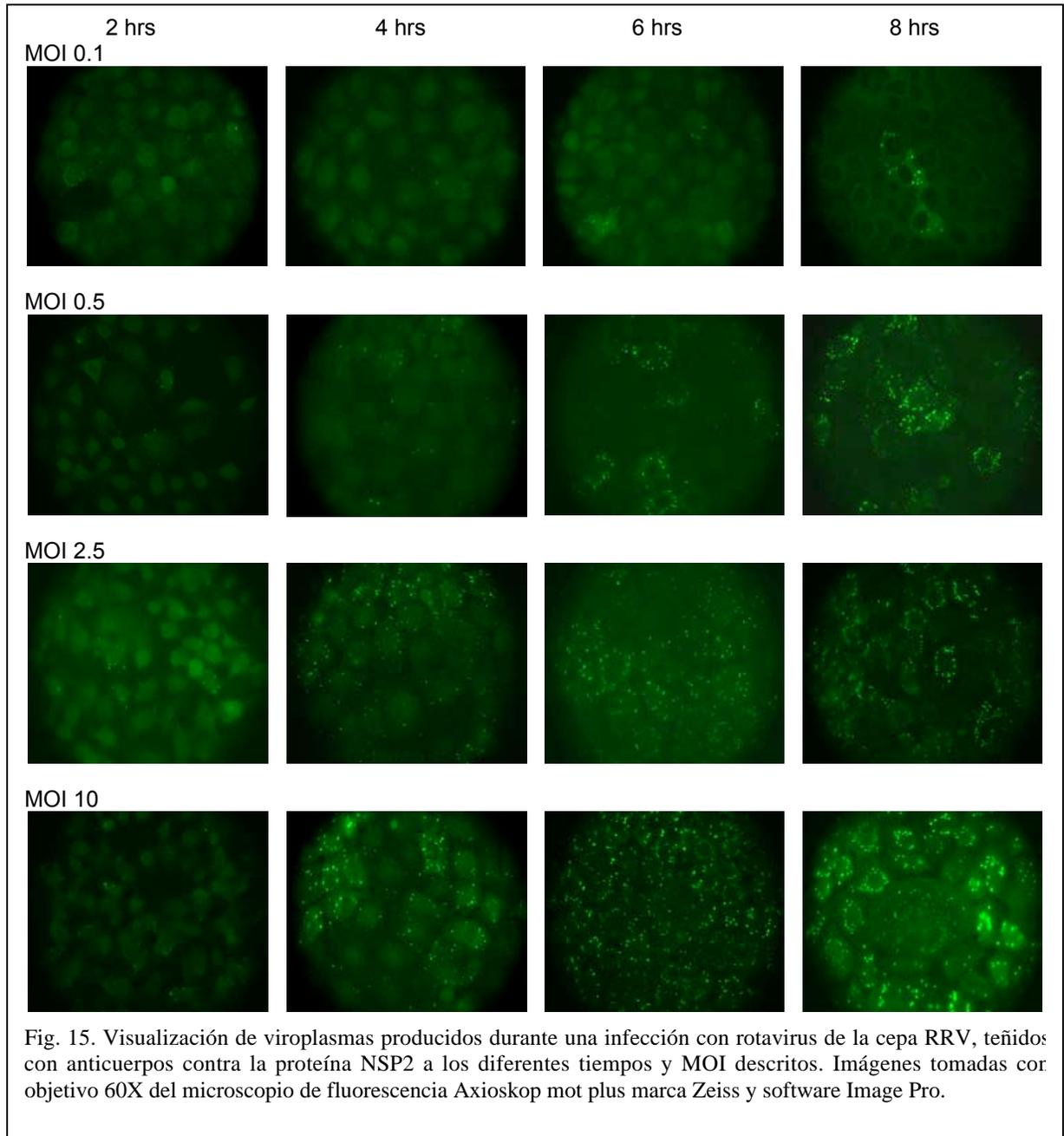


Fig. 15. Visualización de viroplasmos producidos durante una infección con rotavirus de la cepa RRV, teñidos con anticuerpos contra la proteína NSP2 a los diferentes tiempos y MOI descritos. Imágenes tomadas con objetivo 60X del microscopio de fluorescencia Axioskop mot plus marca Zeiss y software Image Pro.

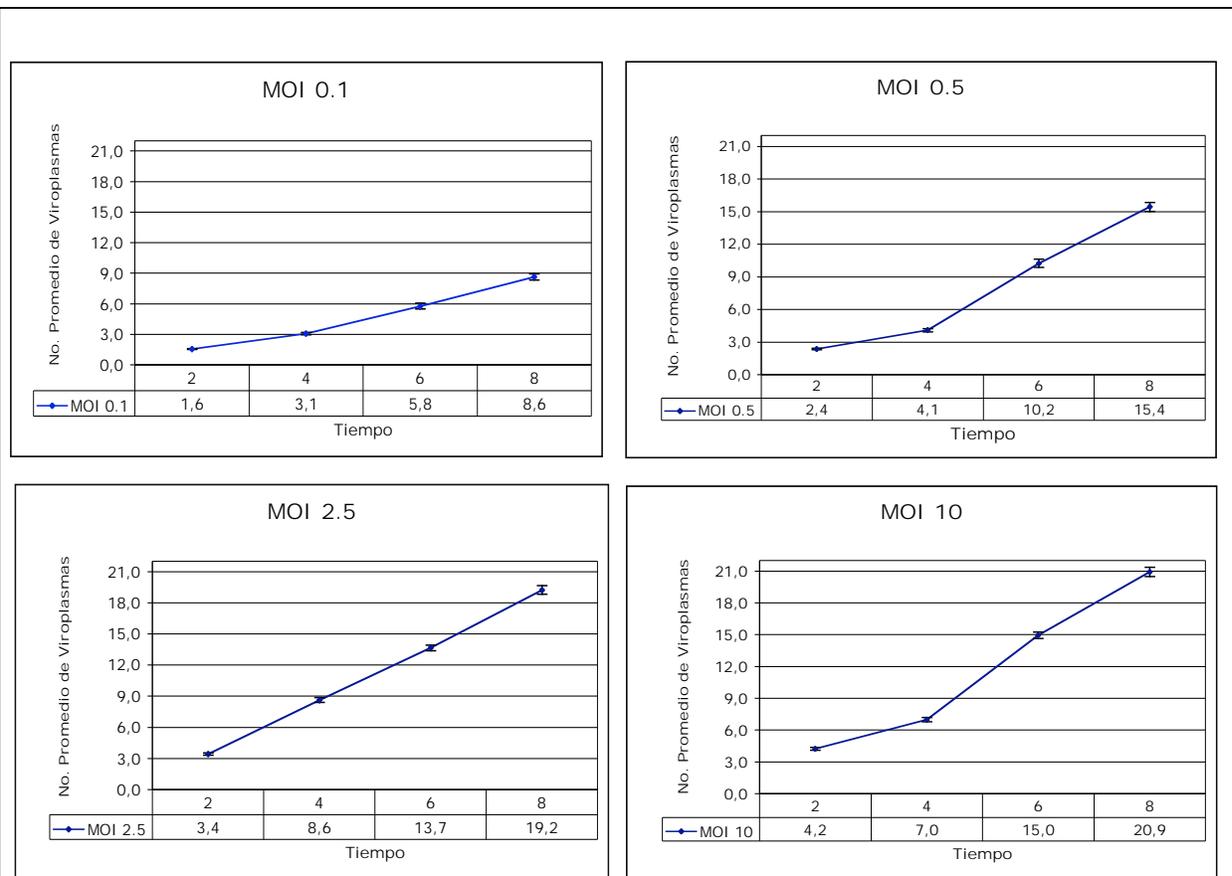


Fig. 16. Promedio y error estándar medio (SEM) de viroplasmias por célula a cada tiempo post-infección analizado en las diferentes MOI utilizadas. Se analizaron 400 células infectadas en cada condición en mínimo 4 diferentes experimentos.

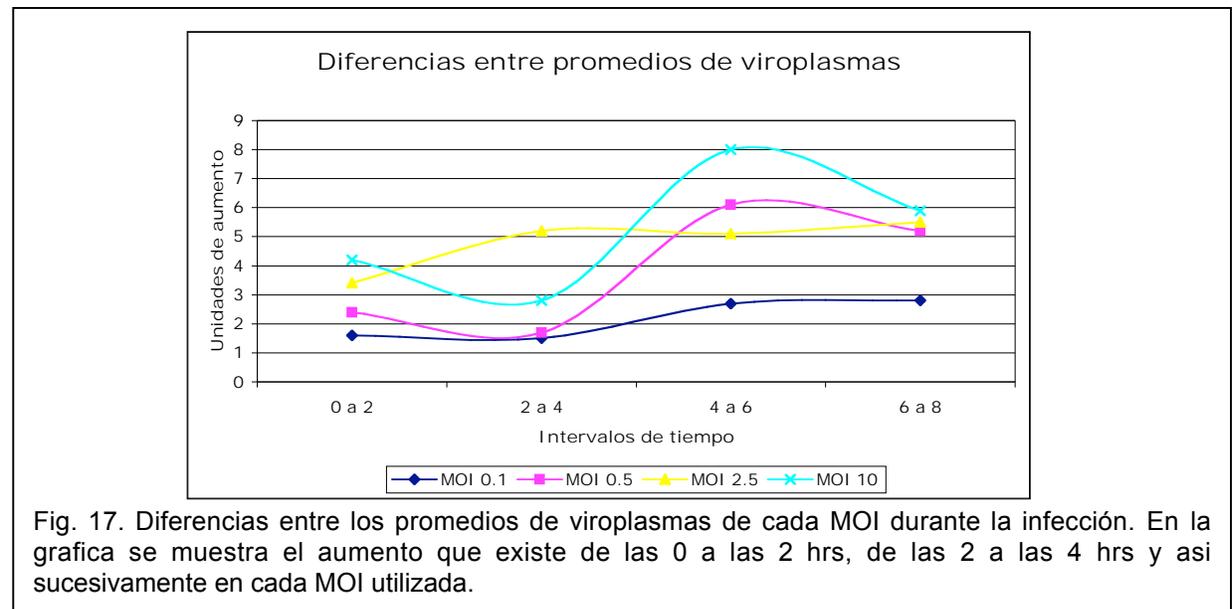
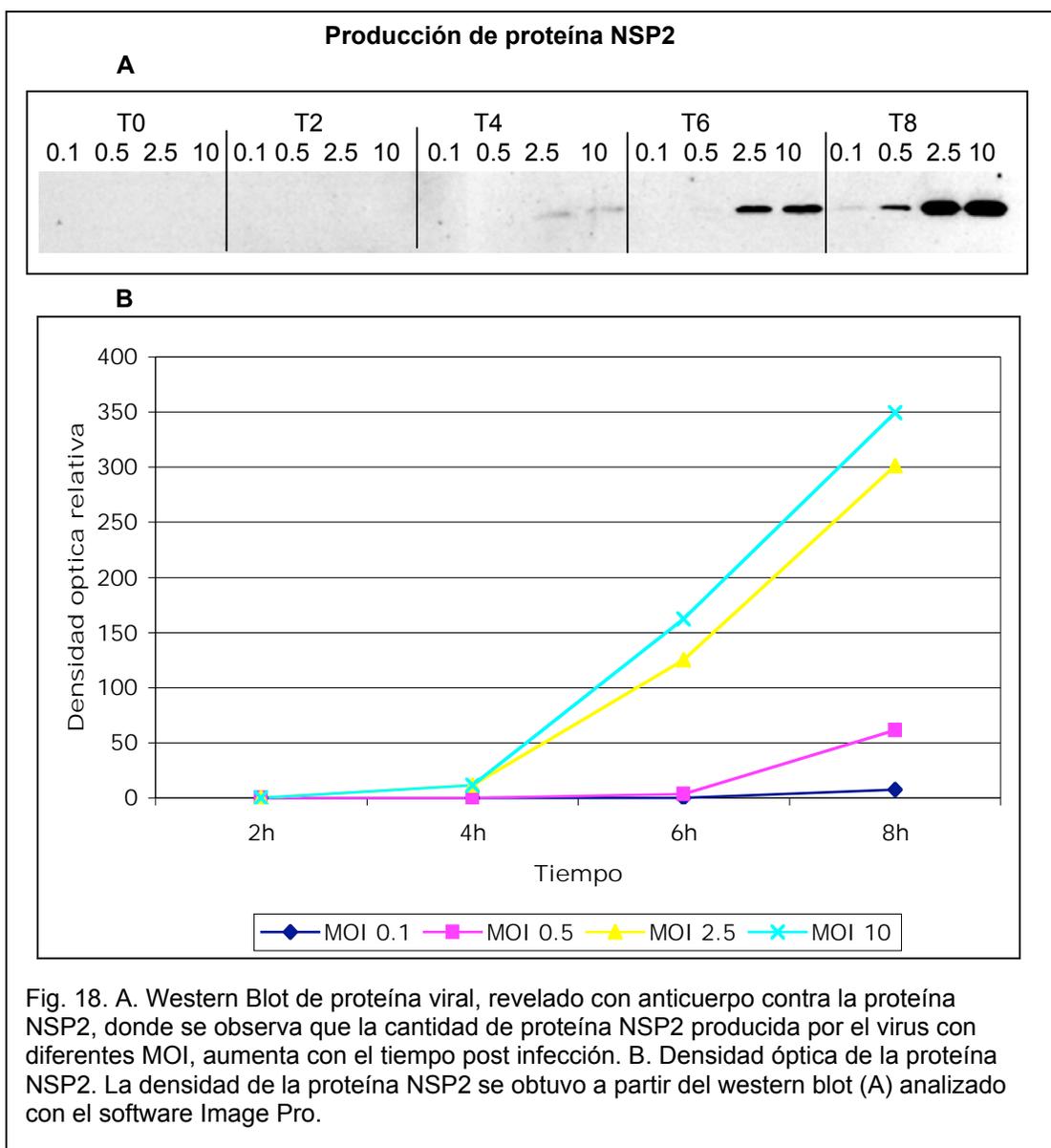


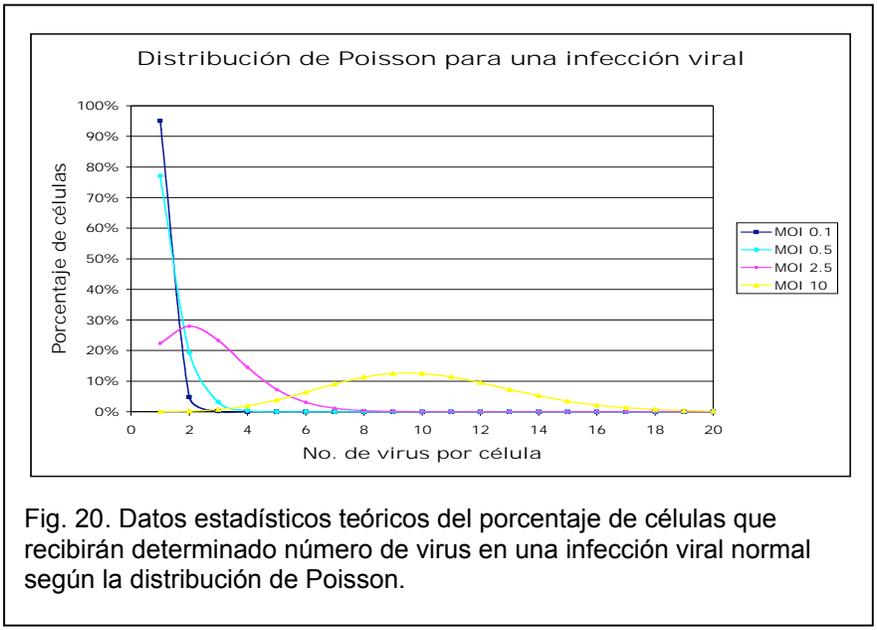
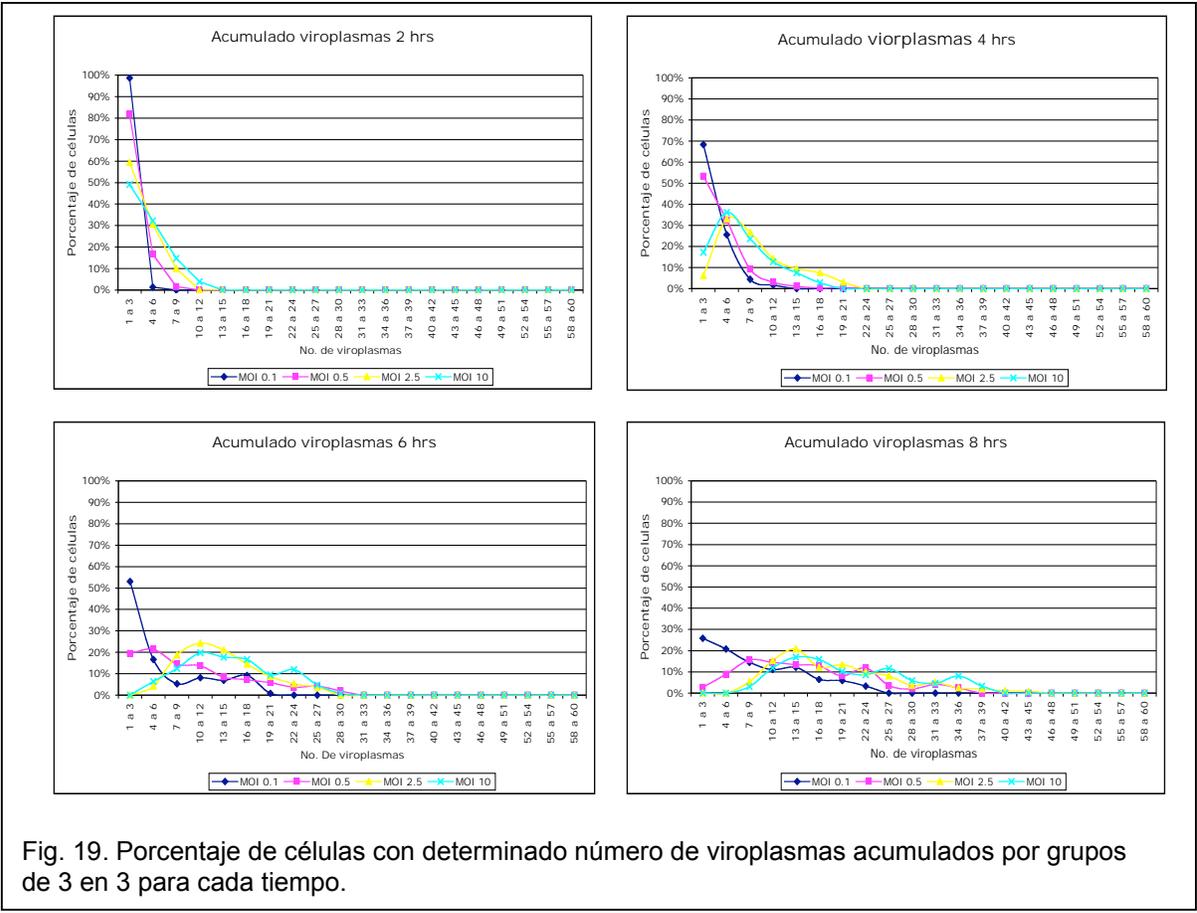
Fig. 17. Diferencias entre los promedios de viroplasmias de cada MOI durante la infección. En la grafica se muestra el aumento que existe de las 0 a las 2 hrs, de las 2 a las 4 hrs y así sucesivamente en cada MOI utilizada.

Para corroborar que el aumento de viroplasma es concomitante con la síntesis de proteína, células MA104 crecidas en cajas de 24 pozos fueron infectadas con las mismas MOI's y cosechadas a los tiempos anteriormente descritos. La cantidad de proteína NSP2 se detectó por inmunotinción (Fig. 18 A). Se observó que el aumento en la cantidad y tamaño de los viroplasma, corresponde al aumento de la proteína NSP2 detectada. Además se observó, realizando un análisis de densitometría (Fig 18 B), que el aumento de proteína viral se dió en mayor proporción a partir de las 4 hpi.



7.4.1 Análisis de la distribución de viroplasma por célula

Para poder analizar la cinética de formación de viroplasma por célula de una manera más detallada, los datos se dividieron en clases de acuerdo a métodos estadísticos establecidos (21), quedando cada clase con el número de viroplasma por célula en incrementos de 3 (Fig. 19). Se compararon las diferentes MOI utilizadas en cada tiempo con su distribución de Poisson. Independientemente de la MOI, se observó que la curva se desplaza a la derecha conforme aumenta el tiempo post-infección, teniendo las células cada vez mayor cantidad de viroplasma. Comparando las gráficas obtenidas (Fig. 19) con la distribución de Poisson (Fig. 20), la cual se utiliza para describir la distribución de virus por célula en una infección viral teórica, encontramos que para las MOI de 0.1 y 0.5, a 2 hpi se observó una distribución muy similar a su distribución de Poisson. Para la MOI de 2.5 se observó una distribución similar a su distribución de Poisson a 4 hpi. Para la MOI de 10, se presentó una distribución de Poisson hasta las 6 hpi. Estos datos confirman que la cantidad de células que presentan mayor número de viroplasma es mayor en infecciones con MOI más altas, además de que el número de viroplasma por célula también es mayor a tiempos largos y MOI altas. La distribución de viroplasma en células a tiempo corto (2 hrs) se parece a la infección teórica con pocos virus (MOI de 0.1 y 0.5), mientras que a las 4 y 6 hrs estos se parecieron a la infección con varias partículas virales (MOI de 2.5 y 10), sugiriendo que se necesita tiempo para la producción de los viroplasma esperados.



7.5 Análisis de los tamaños de viroplasma

Durante el análisis de número de viroplasma, se observó, no solamente el aumento en el número de viroplasma, sino también, un aumento en el tamaño de los mismos. Para comprobar esta observación, se realizó un análisis de los tamaños de viroplasma en aproximadamente 360 células para cada MOI y tiempo, utilizando el software Image J ver.1.32j. Los datos obtenidos fueron agrupados en 3 grupos seleccionados arbitrariamente dependiendo de su tamaño, primeramente observado a simple vista y posteriormente se hizo una estimación del tamaño aproximado mediante el software y se denominó viroplasma “chicos” aquellos entre 0.4 y 3.3 μm^2 , viroplasma “medianos” entre 3.3 y 6.9 μm^2 y viroplasma “grandes” entre 6.9 y 19.9 μm^2 (Fig.21). En la figura 22 podemos observar que la proporción de viroplasma “chicos” disminuyó conforme aumentó el tiempo post-infección, sin embargo, el número total de ellos continuó aumentando en MOI 0.1 y 0.5. Por el contrario, la proporción de los viroplasma “grandes” aumentó conforme aumentó el tiempo post-infección. Además, se observó que el número de viroplasma “chicos” en la MOI 2.5 y 10, de 6 a 8 hrs, no aumentó como sucede en las otras MOI, por el contrario, disminuyó; esto puede deberse a una saturación de la maquinaria de replicación o traducción.

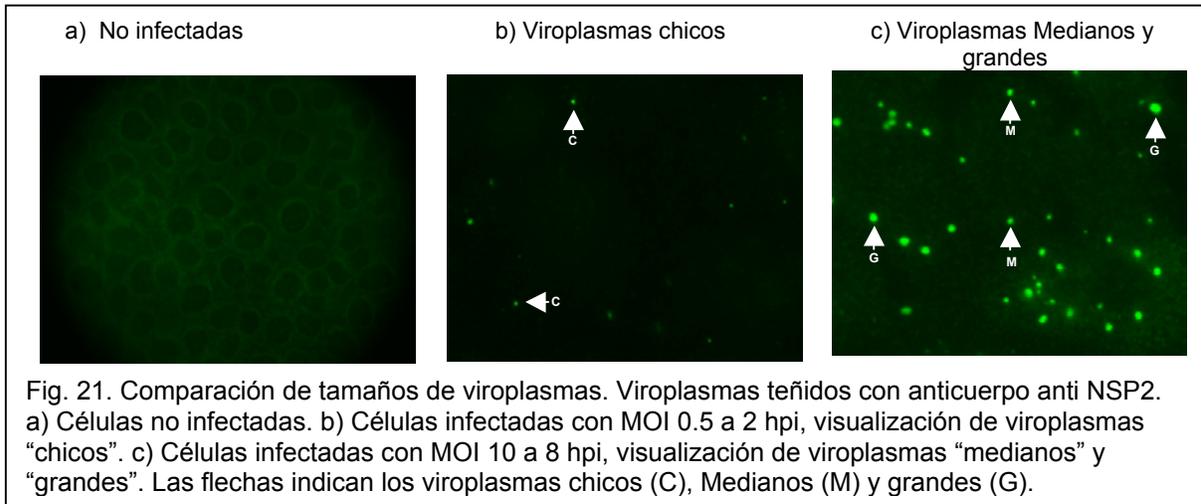


Fig. 21. Comparación de tamaños de viroplasmas. Viroplasmas teñidos con anticuerpo anti NSP2. a) Células no infectadas. b) Células infectadas con MOI 0.5 a 2 hpi, visualización de viroplasmas “chicos”. c) Células infectadas con MOI 10 a 8 hpi, visualización de viroplasmas “medianos” y “grandes”. Las flechas indican los viroplasmas chicos (C), Medianos (M) y grandes (G).

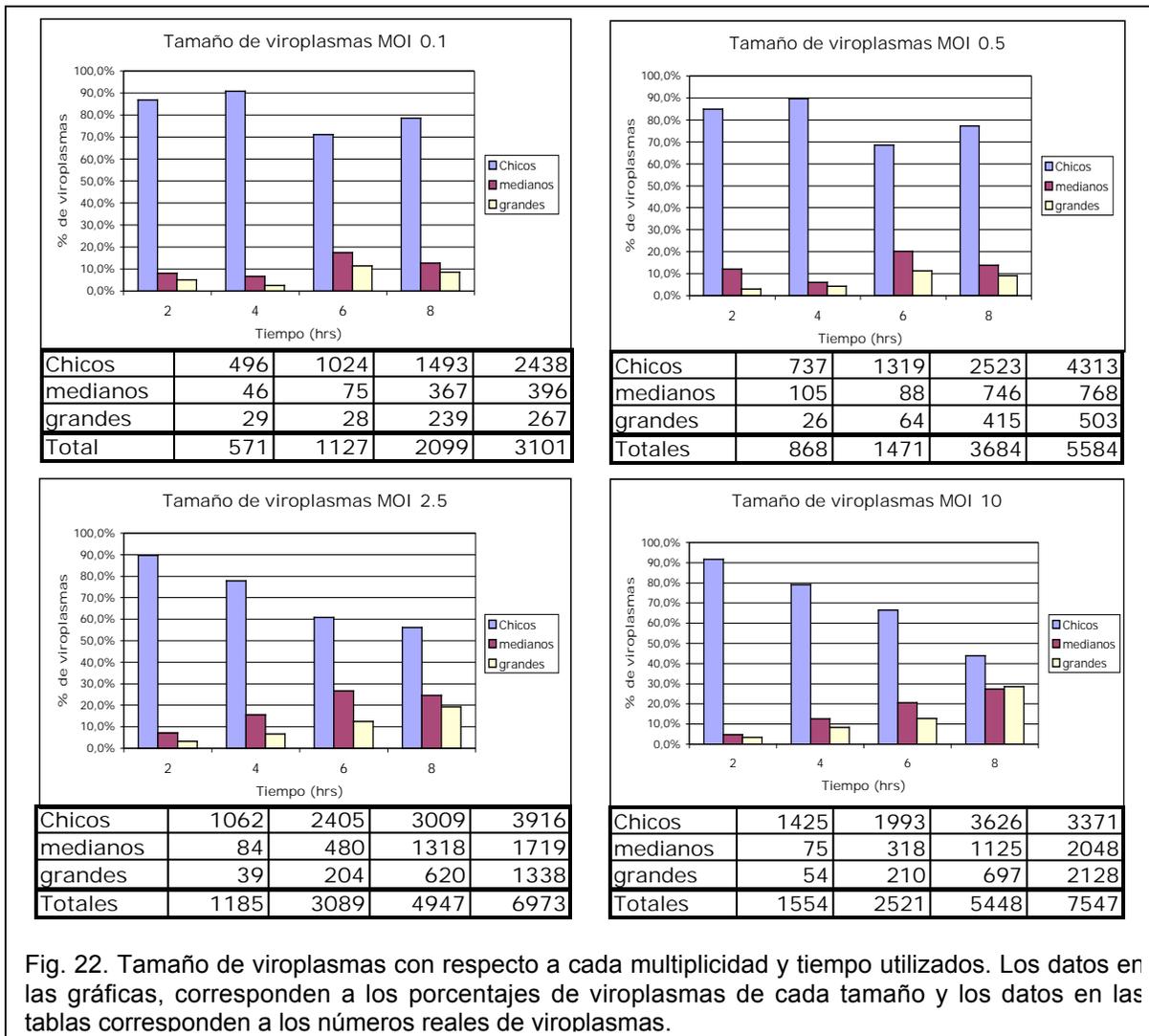


Fig. 22. Tamaño de viroplasmas con respecto a cada multiplicidad y tiempo utilizados. Los datos en las gráficas, corresponden a los porcentajes de viroplasmas de cada tamaño y los datos en las tablas corresponden a los números reales de viroplasmas.

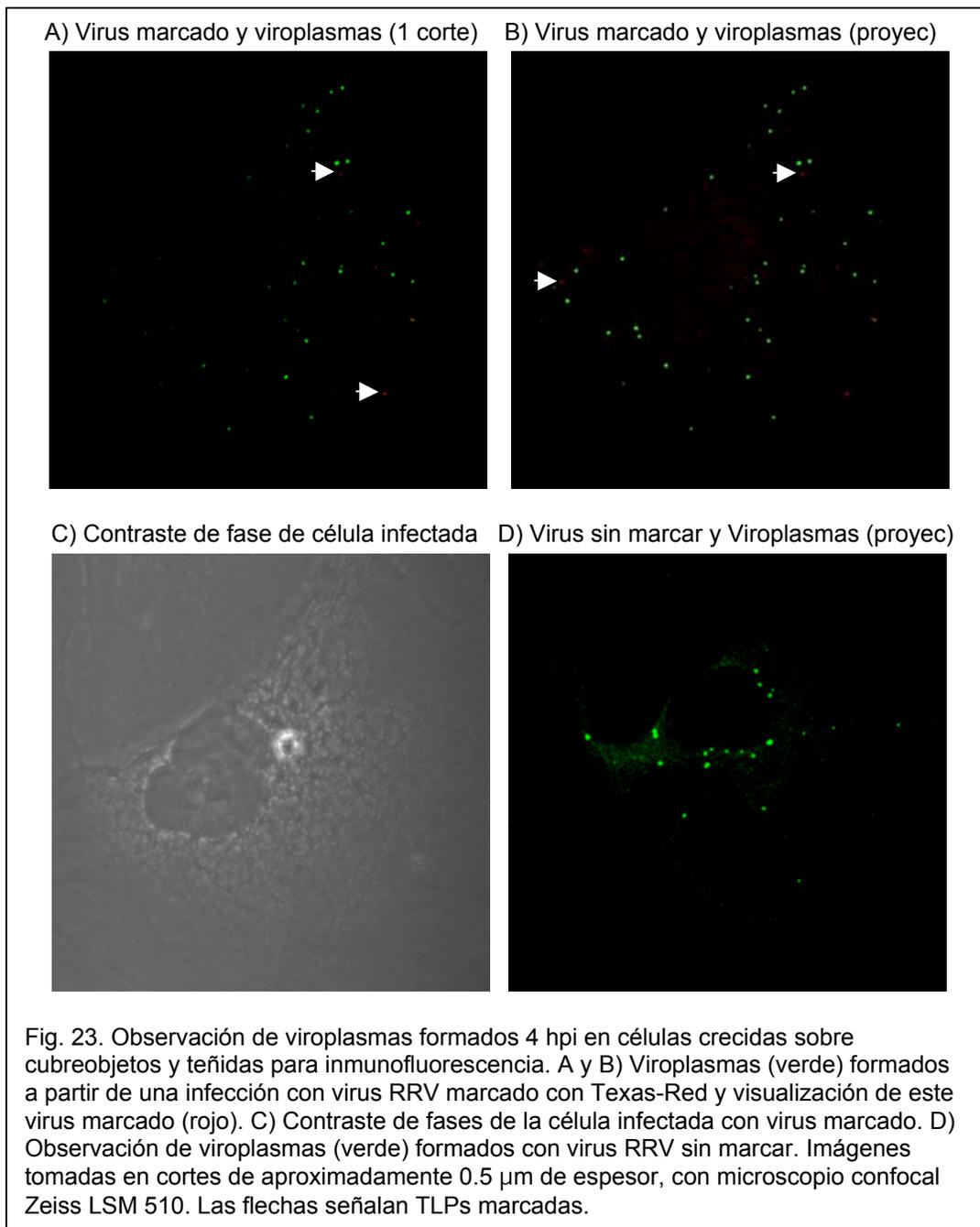
7.6 Visualización de viroplasmos a tiempos cortos

Para tratar de determinar el tiempo en que comienza la síntesis de las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5, se utilizaron células confluentes, crecidas sobre cubreobjetos, infectadas con la cepa RRV (MOI 15 y 100) a tiempos más cortos, de 15, 30, 60 y 90 minutos post infección. Debido a la fluorescencia que presenta el fondo celular, y la poca cantidad de proteína sintetizada a esos tiempos, no fue posible encontrar resultados confiables que permitan la identificación adecuada de los viroplasmos que pudieran estar formados a esos tiempos (datos no mostrados).

7.7 Visualización de viroplasmos y virus marcado

Una vez establecidas las condiciones para marcar el virus y observarlo unido a la superficie y dentro de las células, además de la metodología para visualizar viroplasmos, se realizó un experimento utilizando células confluentes crecidas sobre cubreobjetos infectadas con TLPs de la cepa RRV (MOI 1) marcadas previamente con el fluoróforo Texas-Red. La infección se dejó proceder por 4 hrs. Posteriormente las células se fijaron y los viroplasmos se detectaron como se describió anteriormente. Las preparaciones se montaron y se observaron al microscopio confocal. En estas imágenes se logró observar los viroplasmos formados (verde), y las partículas virales (rojo) en algunos de los cortes realizados (Fig. 23). Se pudo observar que la formación de viroplasmos parece no ser alrededor de la partícula viral sino dispersos en el citoplasma. Como control se utilizó la cepa RRV sin marca, con el cual se infectaron las

células de la misma manera y en las imágenes podemos observar la formación de viroplasmos (verde), pero no la presencia de la partícula viral roja.



8 Discusión

Los rotavirus tienen un ciclo replicativo que involucra varias etapas: la unión, entrada, transcripción, traducción, ensamble y liberación. Durante la unión y entrada, el virus interactúa con varias moléculas presentes en la superficie de las células huésped y se pueden distinguir ambas etapas por cambios en la temperatura de incubación, ya que el virus es capaz de unirse a las células si se encuentra a 4°C, y presentarse la entrada a la célula preferentemente a 37°C. Las etapas de transcripción, traducción y ensamble se llevan por completo en el citoplasma celular, involucrándose en estos procesos al menos 2 estructuras, una estructura formada por las proteínas virales recién sintetizadas llamados viroplasmos y la segunda el RE de la célula huésped, donde se lleva a cabo el ensamble final de las partículas virales, las cuales son liberadas finalmente de la célula por lisis. Este trabajo se llevó a cabo con rotavirus de la cepa RRV y células MA104, las cuales son susceptibles a la infección por rotavirus y han servido de modelo para la investigación del ciclo replicativo de estos virus. Se propuso caracterizar la unión del virus a sus células huésped y la formación de los viroplasmos.

En el estudio de la unión del virus a la célula, se propuso observar por microscopía el virus unido a la célula y colocalizarlo con estructuras de membrana, y se planteó la posibilidad de observar el virus después de una incubación permisible para la entrada del virus a la célula.

Dentro del estudio de formación de viroplasmias, se intentó definir el tiempo transcurrido post infección al cual los viroplasmias pudieran ser observados por microscopía de fluorescencia; caracterizar la formación de los viroplasmias a lo largo de la infección, considerando el número promedio de viroplasmias que se pueden observar por célula a diferentes multiplicidades de infección y a diferentes tiempos post infección. Posteriormente, se evaluó el tamaño de los viroplasmias observados a las diferentes multiplicidades de infección y a los distintos tiempos evaluados anteriormente. Finalmente se intentó colocalizar los viroplasmias formados durante la infección con los virus entrantes.

En el estudio de la unión del virus a la célula se intentó la observación de las partículas virales unidas a la membrana celular por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra las proteínas de la capa externa de rotavirus VP4 y VP7. Sin embargo, no fue posible identificar partículas virales mediante la tinción de estas proteínas. En estudios anteriores, se reportó que es posible ver VLP's de rotavirus marcadas con GFP en la superficie de las células (8). Estas VLP's son partículas que contienen únicamente las proteínas VP2, VP6, VP4 y VP7 y la proteína VP2 se encuentra fusionada con GFP. En otros estudios realizados con virus como poliomavirus marcado con fluoróforo Oregon green se ha visto que es posible colocalizarlo en microtúbulos en cortes de células (25), y con reovirus, conjugado con rodamina B o isotiocianato de fluoresceína ha sido observado en vesículas utilizando microscopía de epifluorescencia (24). Dado que es posible marcar virus directamente y conservar su infectividad, intentamos marcar al virus de la cepa RRV de rotavirus con fluoróforo Texas-Red. Este marcaje se llevó a

cabo con éxito, obteniendo virus marcado el cual se pudo visualizar en el microscopio y conservó su infectividad. Con este virus marcado, se logró hacer una observación del virus unido a la membrana celular, observándolo en el mismo plano que los marcadores de membrana GM1 e integrina $\alpha 2\beta 1$. El virus marcado pareció entrar a la célula después de la incubación por 30 minutos a la temperatura permisiva de 37°C. Estos datos están de acuerdo con el tiempo de entrada de la cepa RRV a la célula huésped.

La caracterización de los viroplasmos se realizó utilizando cultivos de células MA104, crecidas sobre cubreobjetos, infectadas con rotavirus de la cepa RRV. La observación de los viroplasmos fue posible por inmunofluorescencia con anticuerpos contra la proteína NSP2 y anticuerpos secundarios acoplados a Alexa 488 o 568. Se logró observar que la cantidad de viroplasmos depende de la MOI utilizada, ya que a mayor MOI es mayor el número de viroplasmos por célula, obteniendo 1.6 viroplasmos en promedio por célula a 2 hpi con una MOI de 0.1 y 4.2 viroplasmos en promedio con una MOI de 10. Así mismo, se observó que con una misma MOI, el número de viroplasmos aumenta conforme transcurre el tiempo de la infección, obteniendo 4.2 viroplasmos en promedio por célula a 2 hpi y 20.9 viroplasmos en promedio a 8 hpi, ambas con una MOI de 10. Esta observación correlaciona con el aumento total de la proteína sintetizada a lo largo de la infección.

En otros estudios se ha observado que durante el tiempo de la infección disminuye el número de viroplasmos y aumenta su tamaño (16). Los autores de este trabajo proponen que la disminución en número es por fusión de los viroplasmos iniciales.

Estos estudios se realizaron transfectando los genes que codifican para las proteínas NSP2 o NSP5 independientemente, fusionadas a una proteína fluorescente (GFP) y coinfectando con rotavirus a una MOI de 3 (16). Durante ese estudio, la proteína fusionada a GFP se encontraba presente en las células antes de la infección, y esto podría causar los diferentes resultados. Esta observación puede deberse a que no se detectan las proteínas virales sintetizadas *de novo*, sólo se observa la proteína sintetizada con GFP a partir de la transfección previa a la infección, ya que al tener el plásmido pVP16, el cual produce RNAm con una secuencia Poli-A, la traducción del RNAm producido a partir de este plásmido va a ser inhibida por la infección con rotavirus, como sucede para la mayoría de proteínas celulares y no será posible sintetizar nueva proteína con GFP.

En el análisis del tamaño de los viroplasmos, se observó que los viroplasmos no sólo aumentan en número conforme transcurre la infección, si no que además aumenta su tamaño y es mayor conforme aumenta la MOI utilizada. Además, estas observaciones indican que se sigue produciendo proteína viral capaz de formar nuevos viroplasmos. Estos resultados coinciden parcialmente con el trabajo antes mencionado, respecto a que en ambos se observa que el tamaño de los viroplasmos aumenta con el tiempo de la infección, sin embargo, no observan la formación de viroplasmos chicos. Esta observación puede ser causada por la misma razón anteriormente descrita.

Utilizando el virus marcado con el fluoróforo Texas-Red, se realizó una infección de 4 hrs, después de la cual se detectaron los viroplasmos con α -NSP2. En estas imágenes se puede observar que la relación de partículas virales presentes en las células, no

está en relación 1 a 1 con respecto a los viroplasma presentes. Tampoco los virus colocalizan con los viroplasma producidos, lo cual sugiere que los viroplasma no se forman alrededor de la DLP con la cual se infectó la célula. A favor de esto es también la observación de que, aunque se realice una infección con MOI bajas (0.1 o 0.5), a tiempos cortos (2 y 4 hrs), se observan en promedio más de un viroplasma por célula. Esto sugiere nuevamente la formación de viroplasma independientemente de la partícula viral que infectó la célula, ya que se esperaría sólo un viroplasma por célula en el 95.1% de las células infectadas (9.52% de la población total de células) con una MOI de 0.1.

Todavía no se conoce qué señales dirigen la organización de los viroplasma, o el sitio en el citoplasma donde se van a formar, pero al parecer, los viroplasma no se forman alrededor de las DLPs.

9 Conclusiones

Se logró marcar el virus con moléculas fluorescentes y se mantuvo su infectividad. Fue posible la identificación de las proteínas que fueron marcadas, así mismo, estos virus fueron visibles en el microscopio y se logró colocalizarlos con estructuras de membrana.

No fue posible hacer el seguimiento del virus durante la entrada, sin embargo, se logró observar este virus marcado en el interior de las células.

El número de viroplasmos aumenta durante toda la infección independientemente de la MOI utilizada, y el número de viroplasmos por célula es menor en MOI's bajas y mayor en MOI's altas, existiendo diferencia significativa en el número de viroplasmos entre todas las MOI estudiadas.

El número de viroplasmos chicos aumenta durante el tiempo de la infección, sin embargo disminuye su proporción; y a MOI altas (2.5 y 10) y tiempos de infección largos (8 hrs), disminuye también su número total. Por el contrario, el número de viroplasmos "grandes", aumenta durante toda la infección. Estos viroplasmos "grandes" parecen ser producto de la acumulación de proteína en los viroplasmos iniciales.

El conjunto de estas observaciones, sugiere que se satura la maquinaria de replicación, lo cual correlaciona con el hecho de que, en el western blot contra la proteína NSP2, se observa que ésta aumenta de acuerdo a la MOI y el tiempo, pero a 8 hrs parece haber la misma cantidad de proteína a MOI 2.5 y MOI 10, llegando a un punto de saturación el cual se alcanza a tiempos más cortos con MOI altas y a tiempos más largos con MOI bajas.

Los viroplasma parecen no formarse alrededor de las DLPs, ya que aún en células infectadas con una sola partícula viral (MOI 0.1) se observa la formación de más de un viroplasma a tiempos tempranos (2 y 4 hrs). Además, infectando con virus marcado se puede observar que la relación de partículas virales presentes en las células y los viroplasma, no está en relación 1 a 1 y estos no colocalizan.

10 Perspectivas

Teniendo el virus marcado fluorescente, es posible realizar otro tipo de estudios como pudiera ser el seguimiento de un virus en una infección *in vivo*. El hecho de contar con este virus completo y marcado abre varias posibilidades para su estudio, en especial mediante el uso de la microscopía, lo cual nos puede aportar gran cantidad de información respecto a las primeras etapas de la interacción del virus con su célula huésped y probablemente se podría llegar a definir el momento en que el virus pierde su capa externa.

11 Referencias

1. **Afrikanova, I., E. Fabbretti, M. C. Miozzo, and O. R. Burrone.** 1998. Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *J Gen Virol* **79** (Pt 11):2679-86.
2. **Afrikanova, I., M. C. Miozzo, S. Giambiagi, and O. Burrone.** 1996. Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. *J Gen Virol* **77** (Pt 9):2059-65.
3. **Arias, C. F., P. Romero, V. Alvarez, and S. Lopez.** 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol* **70**:5832-9.
4. **Bican, P., J. Cohen, A. Charpilienne, and R. Scherrer.** 1982. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J Virol* **43**:1113-7.
5. **Bines, J.** 2005. Intussusception and rotavirus vaccines. *Vaccine*.
6. **Bishop, R. F., G. P. Davidson, I. H. Holmes, and B. J. Ruck.** 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* **2**:1281-3.
7. **Charpilienne, A., J. Lepault, F. Rey, and J. Cohen.** 2002. Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. *J Virol* **76**:7822-31.
8. **Charpilienne, A., M. Nejmeddine, M. Berois, N. Parez, E. Neumann, E. Hewat, G. Trugnan, and J. Cohen.** 2001. Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *J Biol Chem* **276**:29361-7.
9. **Chen, D., and J. T. Patton.** 1998. Rotavirus RNA replication requires a single-stranded 3' end for efficient minus-strand synthesis. *J Virol* **72**:7387-96.
10. **Chnaiderman Xiao, J., M. Barro, and E. Spencer.** 2002. NSP5 phosphorylation regulates the fate of viral mRNA in rotavirus infected cells. *Arch Virol* **147**:1899-911.
11. **Ciarlet, M., S. E. Crawford, E. Cheng, S. E. Blutt, D. A. Rice, J. M. Bergelson, and M. K. Estes.** 2002. VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. *J Virol* **76**:1109-23.
12. **Cohen, J., A. Charpilienne, S. Chilmonczyk, and M. K. Estes.** 1989. Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. *Virology* **171**:131-40.
13. **Coulson, B. S., S. L. Londrigan, and D. J. Lee.** 1997. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:5389-94.
14. **Dormitzer, P. R., Z. Y. Sun, G. Wagner, and S. C. Harrison.** 2002. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *Embo J* **21**:885-97.
15. **Dundr, M., J. G. McNally, J. Cohen, and T. Misteli.** 2002. Quantitation of GFP-fusion proteins in single living cells. *J Struct Biol* **140**:92-9.
16. **Eichwald, C., J. F. Rodriguez, and O. R. Burrone.** 2004. Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J Gen Virol* **85**:625-34.

17. **Estes, M. K.** 1996. Rotaviruses and their replication. In B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York, N.Y.:1625-1655.
18. **Estes, M. K., and J. Cohen.** 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* **53**.
19. **Estes, M. K., D. Y. Graham, E. M. Smith, and C. P. Gerba.** 1979. Rotavirus stability and inactivation. *J Gen Virol* **43**:403-9.
20. **Fabbretti, E., I. Afrikanova, F. Vascotto, and O. R. Burrone.** 1999. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol* **80 (Pt 2)**:333-9.
21. **Freund, J. E., and G. A. Simon.** 1992. *Modern elementary statistics*, 8th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.
22. **Fuentes-Panana, E. M., S. Lopez, M. Gorziglia, and C. F. Arias.** 1995. Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses. *J Virol* **69**:2629-32.
23. **Gallegos, C. O., and J. T. Patton.** 1989. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* **172**:616-27.
24. **Georgi, A., C. Mottola-Hartshorn, A. Warner, B. Fields, and L. B. Chen.** 1990. Detection of individual fluorescently labeled reovirions in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:6579-83.
25. **Gilbert, J. M., and T. L. Benjamin.** 2000. Early steps of polyomavirus entry into cells. *J Virol* **74**:8582-8.
26. **González, R. A., R. Espinosa, P. Romero, S. Lopez, and C. F. Arias.** 2000. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch Virol* **145**:1963-73.
27. **Gonzalez, R. A., M. A. Torres-Vega, S. Lopez, and C. F. Arias.** 1998. In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch Virol* **143**:981-96.
28. **Greenberg, H., V. McAuliffe, J. Valdesuso, R. Wyatt, J. Flores, A. Kalica, Y. Hoshino, and N. Singh.** 1983. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect Immun* **39**:91-9.
29. **Guerrero, C. A., E. Mendez, S. Zarate, P. Isa, S. Lopez, and C. F. Arias.** 2000. Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:14644-9.
30. **Hewish, M. J., Y. Takada, and B. S. Coulson.** 2000. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol* **74**:228-36.
31. **Horie, Y., O. Nakagomi, Y. Koshimura, T. Nakagomi, Y. Suzuki, T. Oka, S. Sasaki, Y. Matsuda, and S. Watanabe.** 1999. Diarrhea induction by rotavirus NSP4 in the homologous mouse model system. *Virology* **262**:398-407.
32. **Imai, M., K. Akatani, N. Ikegami, and Y. Furuichi.** 1983. Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J Virol* **47**:125-36.
33. **Isa, P., S. Lopez, L. Segovia, and C. F. Arias.** 1997. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J Virol* **71**:6749-56.
34. **Isa, P., M. Realpe, P. Romero, S. Lopez, and C. F. Arias.** 2004. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* **322**:370-81.

35. **Kaljot, K. T., R. D. Shaw, D. H. Rubin, and H. B. Greenberg.** 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol* **62**:1136-44.
36. **Kapikian, A. Z., and R. M. Chanock.** 1996. Rotaviruses. In B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (eds), *Virology* **2**:1657-1708. Raven Press, New York.
37. **Kozak, M.** 1981. Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res* **9**:5233-52.
38. **Labbe, M., P. Baudoux, A. Charpilienne, D. Poncet, and J. Cohen.** 1994. Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *J Gen Virol* **75 (Pt 12)**:3423-30.
39. **Lawton, J. A., M. K. Estes, and B. V. Prasad.** 1997. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Biol* **4**:118-21.
40. **Liprandi, F., G. Lopez, I. Rodriguez, M. Hidalgo, J. E. Ludert, and N. Mattion.** 1990. Monoclonal antibodies to the VP6 of porcine subgroup I rotaviruses reactive with subgroup I and non-subgroup I non-subgroup II strains. *J Gen Virol* **71 (Pt 6)**:1395-8.
41. **Liu, M., N. M. Mattion, and M. K. Estes.** 1992. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology* **188**:77-84.
42. **Lopez, S., and C. F. Arias.** 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol* **12**:271-8.
43. **Lopez, S., Arias F. C.** 2003. Attachment and post-attachment receptors for rotavirus. In: U. Desselberger and J Gray (Eds), *Viral Gastroenteritis*, Elsevier Science, Amsterdam.
44. **Ludert, J. E., B. B. Mason, J. Angel, B. Tang, Y. Hoshino, N. Feng, P. T. Vo, E. M. Mackow, F. M. Ruggeri, and H. B. Greenberg.** 1998. Identification of mutations in the rotavirus protein VP4 that alter sialic-acid-dependent infection. *J Gen Virol* **79 (Pt 4)**:725-9.
45. **McCrae, M. A., and J. G. McCorquodale.** 1983. Molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of viral RNA species. *Virology* **126**:204-12.
46. **Mendez, E., C. F. Arias, and S. Lopez.** 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J Virol* **67**:5253-9.
47. **Mendez, E., S. Lopez, M. A. Cuadras, P. Romero, and C. F. Arias.** 1999. Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology* **263**:450-9.
48. **Meng, Z. D., C. Birch, R. Heath, and I. Gust.** 1987. Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotaviruses. *Appl Environ Microbiol* **53**:727-30.
49. **Mitchell, D. B., and G. W. Both.** 1990. Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. *Virology* **177**:324-31.
50. **Mitzel, D. N., C. M. Weisend, M. W. White, and M. E. Hardy.** 2003. Translational regulation of rotavirus gene expression. *J Gen Virol* **84**:383-91.
51. **Munro, S., and H. R. Pelham.** 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**:899-907.
52. **Nakagomi, O., and T. Nakagomi.** 1991. Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus. *Arch Virol* **120**:43-55.

53. **Padilla-Noriega, L., R. Werner-Eckert, E. R. Mackow, M. Gorziglia, G. Larralde, K. Taniguchi, and H. B. Greenberg.** 1993. Serologic analysis of human rotavirus serotypes P1A and P2 by using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* **31**:622-8.
54. **Pando, V., P. Isa, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* **295**:190-200.
55. **Parashar, U. D., J. S. Bresee, J. R. Gentsch, and R. I. Glass.** 1998. Rotavirus. *Emerg Infect Dis* **4**:561-70.
56. **Parashar, U. D., E. G. Hummelman, J. S. Bresee, M. A. Miller, and R. I. Glass.** 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* **9**:565-72.
57. **Patton, J. T., and D. Chen.** 1999. RNA-binding and capping activities of proteins in rotavirus open cores. *J Virol* **73**:1382-91.
58. **Patton, J. T., Kearney, K., and Taraporewala, z.I.** 2003. Rotavirus genome replication: role of the RNA-binding proteins. In: U. Desselberger and J Gray (Eds), *Viral Gastroenteritis*, Elsevier Science, Amsterdam.
59. **Patton, J. T., and E. Spencer.** 2000. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* **277**:217-25.
60. **Patton, J. T., M. Wentz, J. Xiaobo, and R. F. Ramig.** 1996. cis-Acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA. *J Virol* **70**:3961-71.
61. **Pesavento, J. B., S. E. Crawford, E. Roberts, M. K. Estes, and B. V. Prasad.** 2005. pH-induced conformational change of the rotavirus VP4 spike: implications for cell entry and antibody neutralization. *J Virol* **79**:8572-80.
62. **Ramig, R. F.** 2004. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* **78**:10213-20.
63. **Sánchez-San Martín, C., T. Lopez, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol* **78**:2310-8.
64. **Schuck, P., Z. Taraporewala, P. McPhie, and J. T. Patton.** 2001. Rotavirus nonstructural protein NSP2 self-assembles into octamers that undergo ligand-induced conformational changes. *J Biol Chem* **276**:9679-87.
65. **Vaughn, J. M., Y. S. Chen, and M. Z. Thomas.** 1986. Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine. *Appl Environ Microbiol* **51**:391-4.
66. **Wentz, M. J., J. T. Patton, and R. F. Ramig.** 1996. The 3'-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **70**:7833-41.
67. **Yolken, R. H., R. Willoughby, S. B. Wee, R. Miskuff, and S. Vonderfecht.** 1987. Sialic acid glycoproteins inhibit in vitro and in vivo replication of rotaviruses. *J Clin Invest* **79**:148-54.
68. **Zarate, S., M. A. Cuadras, R. Espinosa, P. Romero, K. O. Juarez, M. Camacho-Nuez, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2003. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J Virol* **77**:7254-60.
69. **Zarate, S., R. Espinosa, P. Romero, E. Mendez, C. F. Arias, and S. Lopez.** 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J Virol* **74**:593-9.
70. **Zeng, C. Q., M. J. Wentz, J. Cohen, M. K. Estes, and R. F. Ramig.** 1996. Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants. *J Virol* **70**:2736-42.

71. **Zhao, W., M. Xia, T. Bridges-Malveo, M. Cantu, M. M. McNeal, A. H. Choi, R. L. Ward, and K. Sestak.** 2005. Evaluation of rotavirus dsRNA load in specimens and body fluids from experimentally infected juvenile macaques by real-time PCR. *Virology* **341**:248-56.