



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

***CARACTERIZACION DE LA INFECTIVIDAD DE
ROTAVIRUS EN CELULAS POLARIZADAS MDCKII***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. MAURICIO ALBERTO REALPE QUINTERO

DIRECTOR DE TESIS **DR. CARLOS F. ARIAS ORTIZ**

CUERNAVACA, MORELOS. MEXICO
2010



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.

A Sebastián Realpe Fierro...

nuestro motor

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Carlos Arias. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Estudios de Postgrado (DGEP), a través de la beca otorgada según oficio DGEP/SAP/PBN/856/2000.

LISTA DE ABREVIATURAS

AJC	Complejo de Unión Intercelular Apical
AJ	Uniones adherentes (Adherens Junctions)
AS	Ácido siálico
BSA	Albúmina de suero bovino
RNAcs	Ácido ribonucleico de cadena sencilla
RNAdc	Ácido ribonucleico de doble cadena
DLP	Partículas de doble capa
DMEM	Medio mínimo esencial de Eagle, modificado por Dulbecco
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FFU	Unidades formadoras de focos
hpi	horas post infección
Hsc	Proteína constitutiva de choque térmico
IIF	Inmunofluorescencia
KDa	Kilo Daltons
MA104	Células epiteliales de riñón de mono
MDCK	Células epiteliales de riñón de perro aisladas por Madin-Darby
MEM	Medio mínimo esencial de Eagle
MOI	Multiplicidad de infección
NA	Neuraminidasa
Nar3	Variante resistente a tratamiento con neuraminidasa del rotavirus de mono rhesus.
NSP	Proteína no estructural
PBS	Solución salina de buffer de fosfatos
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TEER	Resistencia eléctrica trans-epitelial
TFR41	Cepa de rotavirus TFR41 de origen porcino
TJ	Uniones estrechas (Tight Junctions)
TLP	Partículas de tres capas
VP4	Proteína viral 4
VP5*	Proteína Viral 5
VP8*	Proteína Viral 8
VLP	Partícula parecida a virus
RRV	Rotavirus de mono rhesus
UK	Cepa de rotavirus UK de origen bovino
Wa	Cepa de rotavirus Wa de origen humano

INDICE

	Página
RESUMEN	7
 CAPITULO I	
1 INTRODUCCION	
<i>1.1 Generalidades</i>	9
<i>1.2 Patogénesis</i>	19
<i>1.3 Entrada a la célula blanco</i>	20
 2 RECEPTORES CELULARES PARA ROTAVIRUS	
<i>2.1 Receptores de anclaje (uso de glicanos)</i>	22
<i>2.2 Receptores post adhesion</i>	24
<i>2.3 Modelo de entrada a la célula hospedera</i>	26
<i>2.4 Rotavirus infecta células polarizadas de origen epitelial</i>	27
<i>2.5 Los patógenos intestinales pueden perturbar la barrera epitelial</i>	31
 3 OBJETIVOS	
<i>3.1 Objetivo General</i>	34
<i>3.2 Metas Específicas</i>	34

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1	<i>Células y virus</i>	35
4.2	<i>Anticuerpos y reactivos</i>	35
4.3	<i>Ensayos de infectividad</i>	36
4.4	<i>Infección en soportes permeables</i>	36
4.5	<i>Tratamiento de células y virus</i>	37
4.6	<i>Tratamiento con EGTA</i>	37
4.7	<i>Unión de virus a la membrana celular</i>	37
4.8	<i>Silenciamiento de la expresión de integrinas</i>	38
4.9	<i>Inmunofluorescencia</i>	38

CAPITULO II

5	RESULTADOS	40
----------	-------------------	-----------

6	DISCUSION	41
----------	------------------	-----------

7	CONCLUSIONES	50
----------	---------------------	-----------

	REFERENCIAS	51
--	--------------------	-----------

RESUMEN

In células epiteliales, el principal blanco de la infección por rotavirus, las integrinas constituyen complejos esenciales en adhesión inter-celular. Dichos complejos son colesterol-dependientes y las integrinas, las cuales han sido propuestas como receptores para rotavirus, exhiben distribución preferencial por el dominio basolateral y por tanto son inaccesibles para la entrada de rotavirus. En este trabajo se describen las primeras interacciones con células polarizadas de la línea MDCKII, de algunas cepas de rotavirus representativas de la dependencia de ácido siálico (AS+ o AS- según el caso). Se evalúa su dependencia de ácido siálico, el requerimiento de algunas proteínas de la cápside externa, y la polaridad de infección al modular los complejos de adhesión intercelular apical mediante EGTA. También se evalúa la polaridad de infección mediante incubación directa con la superficie basolateral de monocapas de células cultivadas sobre soportes permeables. La infectividad se incrementó al exponer los bordes celulares quelando el calcio extracelular y este comportamiento fue reversible al restituir el nivel normal de este catión. El aumento de infectividad se asoció con eventos iniciales de entrada de rotavirus a su célula hospedera, su principal componente parece ser a nivel post-unión, y su magnitud fue cepa-dependiente, siendo más pronunciada para cepas AS-. La cepa AS+ RRV requirió de AS para infectar células MDCKII y dependió de interacciones a través de su proteína VP8*, a un nivel similar que su cepa variante NAR3, la cual es AS-. Rotavirus mostró mayor infectividad desde el dominio basolateral y requirió de las integrinas alfa2beta1 y alfaVbeta3 según sugiere el silenciamiento de estas mediante metodologías de siRNA. Estos resultados sugieren una importante interacción con la superficie basolateral para la eficiente infectividad de rotavirus en general, la cual es más pronunciada para cepas AS. La distribución de los putativos receptores para rotavirus en células epiteliales concuerda con los resultados obtenidos y permite estudiar su patogénesis en un modelo celular más similar al blanco de infección *in vivo*.

ABSTRACT

In epithelial cells, the main target of rotavirus infection, integrins are part of protein complexes involved in inter-cellular and cell-substrate adhesion functions. These assemblies are cholesterol-dependent. Integrins, which has been also proposed as rotavirus receptors, exhibit preferential basolateral distribution therefore their function as rotavirus cell-entry-receptors remains partially understood for a pathogen which uses the oroal-faecal route of infection. Here, the first interactions with polarized Madin-Darby Canine Kidney (MDCKII) cells for representative sialic acid dependent (SA+) and non-sialic acid dependent (TSA-) rotavirus strains, are described. It was evaluated their dependence on sialic acid, the requirement of some outer capsid proteins, and the polarity of infection upon modulation of the apical junctional complex with EGTA. Infectivity was increased by loosen the cell borders through extracellular calcium chelation and this was reversible upon restoration of this ion to its normal levels. Increased infectivity was associated with early host cell entry of rotavirus, with a major component at a post-binding step, and its magnitude was strain-dependent, being higher pronounced for SA- strains. The SA+ strain RRV did require SA for infecting MDCKII and was dependent on interactions through its VP8* protein, at a similar level than its variant SA- strain NAR3. Rotavirus showed higher infectivity from the basolateral cell domain and it required of integrins alpha2beta1 and alphaVbeta3 according to their silencing through siRNA methodologies. These results support an interaction with the basolateral surface for the efficient infectivity of rotavirus in general, which is more pronounced for SA- strains. These findings correlate with the distribution of putative rotavirus receptors in epithelial cells and allow us to study its pathogenesis in a cellular model more similar to the physiological target of infection *in vivo*.

1 INTRODUCCION

1.1 Generalidades

Rotavirus es la principal causa de diarrea en varias especies de mamíferos neonatos, incluyendo humanos. La diarrea debida a gastroenteritis infecciosa aguda es la causa más frecuente de morbi-mortalidad en niños en los países en desarrollo, con alrededor de mil millones de episodios anuales que ocasiona entre 2.5 y 3.2 millones de muertes (Parashar *et al.*, 2006). Alrededor de 111 millones de estos episodios en menores de 5 años son debidos a rotavirus, constituyendo así la causa principal de diarreas virales deshidratantes severas en niños y responsable de aproximadamente 600.000 a 870.000 muertes al año en todo el mundo. Se estima que el 82% de estas muertes ocurren en países en vías de desarrollo, principalmente por las deficiencias en los servicios de salud o la ausencia de tratamiento (Parashar *et al.*, 2003). Aunque la mortalidad en países en desarrollo es notoriamente mayor que en los industrializados, la frecuencia de infección es la misma (Parashar *et al.*, 2006).

En México, de las muertes estimadas al año por causa de diarrea en niños menores de 5 años, aproximadamente el 40% son causadas por rotavirus (García-Escamilla, 2004; Richardson, *et al.*, 2010). En los adultos el rotavirus rara vez produce la muerte, pero es una causa de morbilidad bajo condiciones de inmunosupresión (WHO, 2007). El Centro Nacional de Enfermedades de la Infancia y la Adolescencia de la Secretaría de Salud de México revela que en la actualidad el costo económico promedio para una familia por episodio de infección con rotavirus es de 1,181 pesos. Lo que implica que solo en México se necesitan 6 millones de dólares para cubrir el tratamiento por infección de rotavirus en niños menores de 5 años (Constenla, *et al.*, 2009; García-Escamilla, 2004).

La principal ruta de transmisión de rotavirus es la vía fecal-oral, aunque también se propone que el contacto persona a persona, el contacto con secreciones respiratorias, y el contacto con superficies contaminadas pueden ser fuentes de transmisión, ya que los altos índices de infección por estos virus en los primeros años de vida en todo el mundo son

independientes de las condiciones higiénicas y sanitarias (Estes, 2001). La infección es especie-específica, aunque se ha sugerido la transmisión de rotavirus entre humanos y animales (Kapikian *et al.*, 2001; Nakagomi & Nakagomi, 1991).

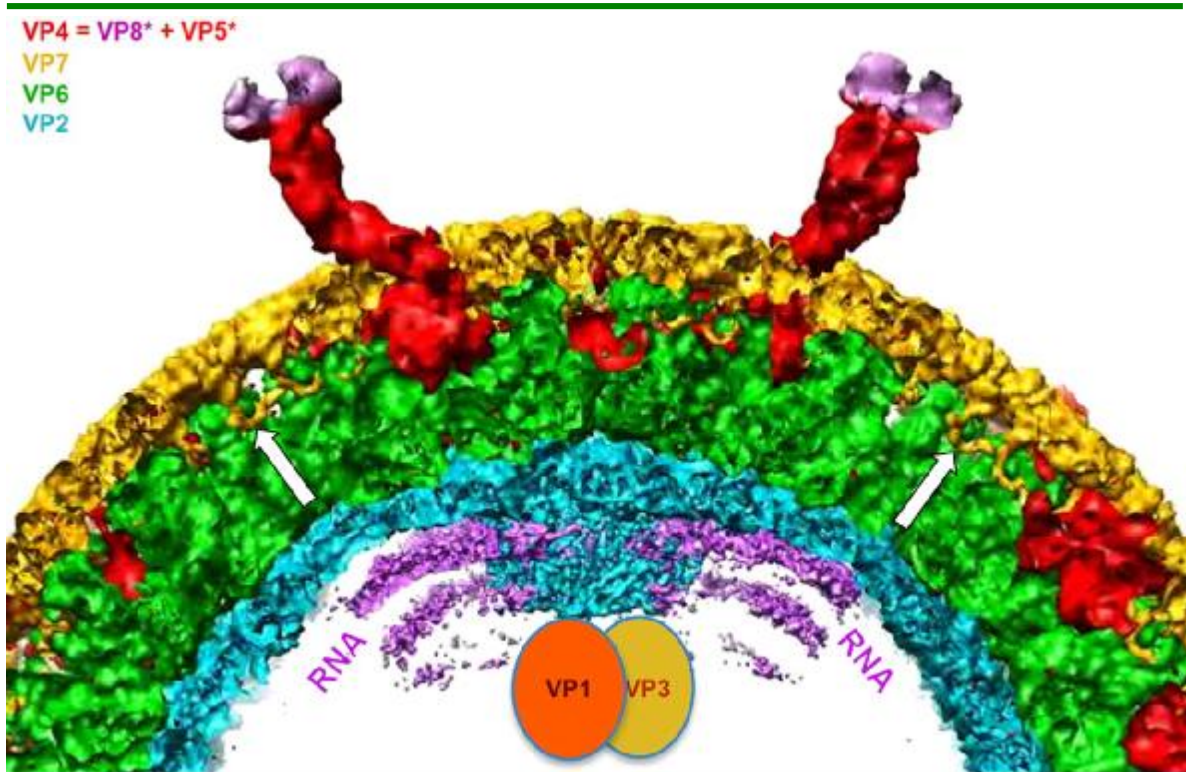


Figura 1. Corte transversal de una partícula de rotavirus basado en datos de reconstrucción por criomicroscopía electrónica. Las proteínas codificadas en los colores mostrados en la esquina superior izquierda. Se pueden apreciar las capas concéntricas de las partículas de triple capa (TLPs), el contacto íntimo con los segmentos del genoma y la localización hipotética de las enzimas polimerasa (VP1) y guanilil-transferasa (VP3). Las espículas de VP4 se muestran como dímeros y las flecha blancas destacan los brazos N-terminales de VP7 que contactan la capa de VP6 subyacente. Dentro de la célula las partículas de doble capa (DLPs), transcripcionalmente activas, liberan el mRNA a través de canales, que también son usados para incorporar nuevos mRNA para replicar el genoma. Tomado de Rey, F.A. 2009. PNAS 106:10398-10399.

Rotavirus, pertenece a la familia *Reoviridae* y exhibe tropismo intestinal.

Es un virus no envuelto, compuesto por tres capas concéntricas de proteína que rodean al genoma viral, el cual está compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena (RNAdc). El genoma codifica para doce proteínas: 6 proteínas estructurales (VP's, por "viral proteins") que por lo tanto forman parte de la partícula viral; y 6 proteínas no-estructurales (NSP's, por "non-structural proteins") las cuales participan en la replicación y maduración del virus, y se encuentran únicamente en células infectadas (Arias *et al.*, 2009). Algunas de las proteínas virales sufren modificaciones post-traduccionales, tales como glicosilación, fosforilación, o cortes proteolíticos (Arias *et al.*, 2002; Estes, 2001; Lawton *et al.*, 1997; Pesavento *et al.*, 2006).

Rotavirus tiene un tropismo muy específico; *in vivo* infecta principalmente los enterocitos de las micro-vellosidades del intestino delgado (Kapikian *et al.*, 2001). Sin embargo, *in vitro* su tropismo es más amplio, pudiendo infectar exitosamente células de diverso origen. 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 (Ciarlet *et al.*, 2002). Además, esencialmente todas las células son permisivas a la replicación siempre que su entrada sea facilitada por lipofección, así que el paso limitante en la infección es a nivel de la entrada a la célula (Arias *et al.*, 2002; Bass *et al.*, 1991; Ciarlet *et al.*, 2002a).

Recientemente se propuso que *in vivo* la infección por rotavirus podría comprometer tejidos y órganos no previamente descritos como blanco, con lo cual esta patogénesis podría tener un componente sistémico bajo circunstancias particulares (Ramig, 2007). Desde un tiempo atrás se han reportado antigenemia y viremia en órganos y líquidos fuera del intestino, sin embargo, no se conocía su papel en la patogénesis viral (Zhao *et al.*, 2001). Recientes hallazgos sugieren que la patogénesis de la enfermedad tanto en humanos como en modelos animales justifican que rotavirus sea considerado un agente capaz de establecer infecciones sistémicas (Banda *et al.*, 2009). La cuidadosa evaluación de la polaridad de infección podría arrojar información crucial para entender los reportes recientes para ciertas cepas de rotavirus, que son capaces de alcanzar tejidos extra-intestinales e infectar vía intersticial

(Azevedo *et al.*, 2005), el conocimiento de la polaridad de infección de distintas cepas puede arrojar elementos sobre el tropismo de este virus *in vivo* y sus mecanismos de patogénesis.

En líneas celulares no polarizadas la entrada de rotavirus es compleja y comprende varias fases que se detallarán más adelante (Méndez *et al.*, 1999; López & Arias, 2003, 2006). Rotavirus *in vitro* puede unirse a una gran variedad de líneas celulares, aunque solo infecta a algunas de ellas (Ciarlet *et al.*, 2002a). Esto sugiere que la unión de rotavirus a la célula es promiscua y que su entrada a la célula depende de un paso posterior a la unión del virus a la superficie celular. Rotavirus inicia su ciclo de infección mediante el reconocimiento de receptores específicos en la membrana de su célula hospedera, los cuales le permiten acceder al citoplasma de una forma aún no bien comprendida (López & Arias, 2004). Considerando la alta complejidad de las primeras interacciones, y como consecuencia el limitado conocimiento de su patogénesis, el rango de células hospederas podría ser mayor a lo esperado; por lo cual el conocimiento de la entrada del virus a la célula adquiere importancia capital para el control de la enfermedad (Ciarlet & Estes, 2001a; Fenaux *et al.*, 2006; Pesavento *et al.*, 2006; Ramig, 2004).

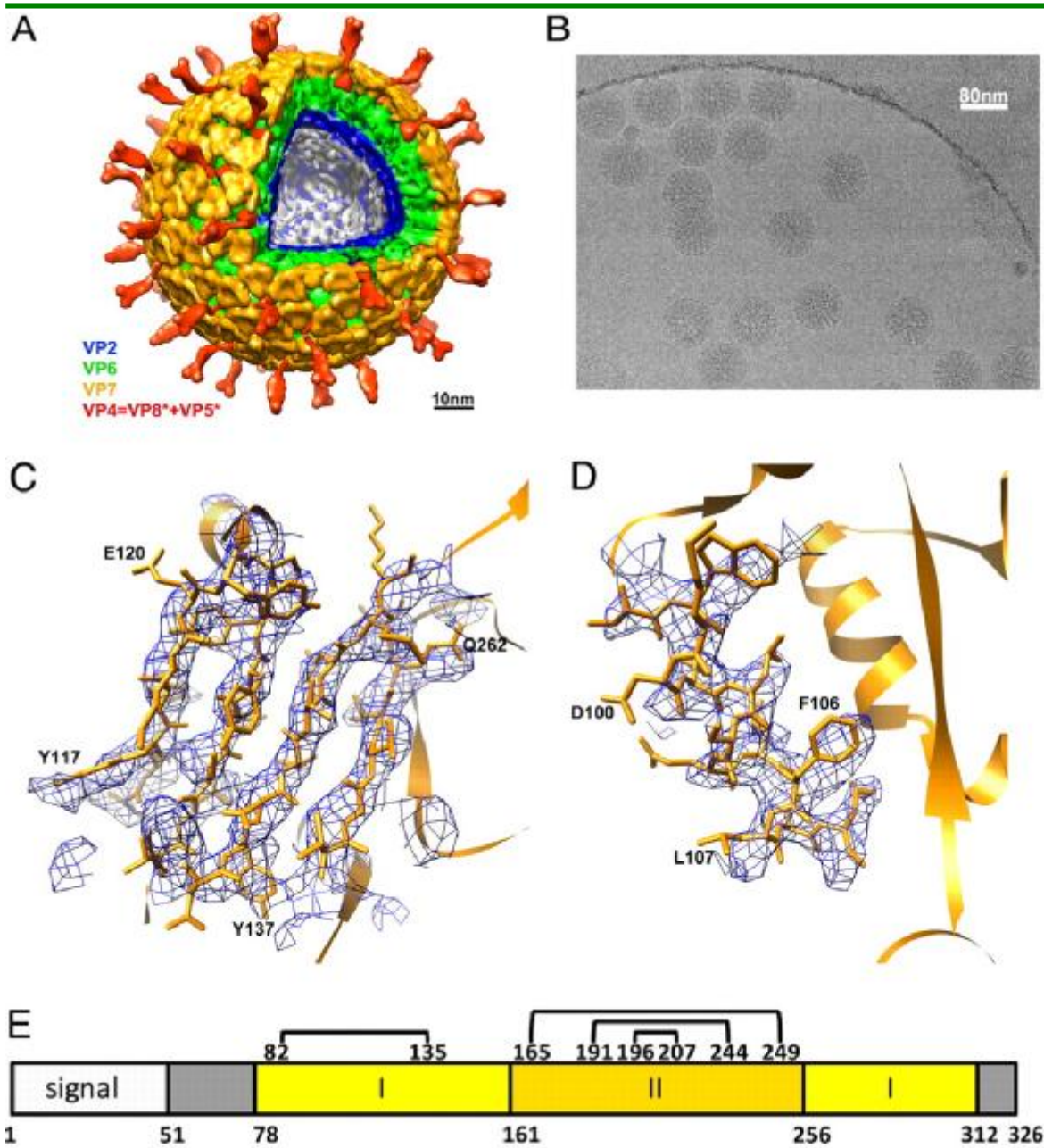


Figura 2. **Detalle del arreglo de la proteína VP7 dentro de la partícula de rotavirus.** (A) Estructura del virión completo a una resolución de 25 Å. (B) Imagen de crio-electromicroscopía de TLPs carentes de la proteína VP4. (C y D) Reconstrucciones de la estructura de VP7, a una resolución de 4.2 Å. (E) Organización por dominios de VP7. En amarillo la región ordenada, en gris las que adquieren estructura definida al interactuar con otras proteínas de la DLP (VP2/VP6). Se destacan los puentes disulfuro mostrando los residuos involucrados en cada uno. Tomado de Chen *et al.*, 2009. PNAS 106:10644-10648.

Rotavirus posee tres capas concéntricas de proteína, diferentes estructural y funcionalmente.

Las partículas virales de triple capa (TLPs) pierden las dos proteínas de la capa externa durante su entrada a la célula, dando lugar a partículas de doble capa (DLPs), las cuales son transcripcionalmente activas. La síntesis de los mensajeros virales se lleva a cabo dentro de las DLPs por medio de una acción concertada de la polimerasa viral VP1, y la guanilil-transferasa VP3, y los transcritos virales sintetizados son exportados al citoplasma celular a través de los canales tipo I localizados en los vértices de la partícula viral icosaédrica.

Las DLPs son responsables de una segunda ronda de transcripción (Ayala *et al.*, 2009), más abundante que la primera, la cual resulta en un segundo ciclo de ensamble de DLPs. Las DLPs recién formadas geman a través de la membrana del retículo endoplásmico (RE). Durante esta gemación, la cual está mediada por la interacción de las DLPs con la proteína NSP4 presente en la membrana del RE, las partículas adquieren una membrana lipídica transitoria. Estas partículas contienen, además de NSP4, las proteínas de superficie VP4 y VP7. Posteriormente, en el lumen del RE se pierde la capa de lípidos a través de un mecanismo no conocido aún, generándose así las TLPs maduras (Maruri-Avidal *et al.*, 2007). Finalmente, los viriones maduros son liberados al medio por lisis celular. Todo el ciclo replicativo de los rotavirus se lleva a cabo en el citoplasma celular, en aproximadamente 12 horas.

La cápside externa de rotavirus dirige la interacción con su célula blanco.

Las interacciones con la superficie de la célula están mediadas por las proteínas de la capa externa, VP7 y VP4 (Fig. 1), responsables de la unión y la penetración de las partículas (López & Arias, 2006; Pesavento *et al.*, 2006). La proteína VP7 conforma la superficie lisa de la cápside externa de rotavirus (Fig. 2). Esta capa debe ser desensamblada durante la entrada para dar lugar a las partículas intracelulares transcripcionalmente activas (Ludert *et al.*, 2002). VP7 contiene los motivos LDV y GRP, que se proponen como 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) (Graham *et al.*, 2002; López & Arias, 2004).

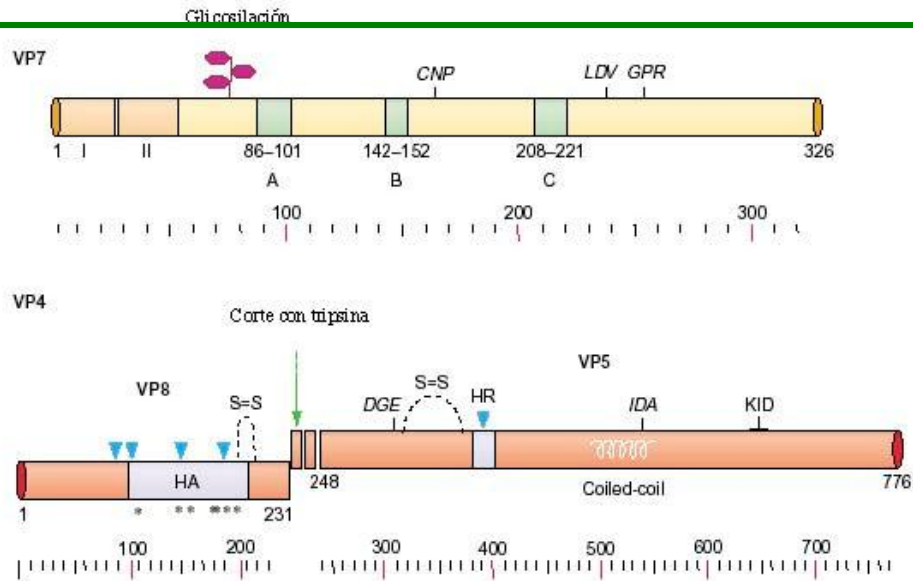


Figura 3. Esquema de las proteínas de la cápside externa de rotavirus. La proteína VP7 contiene los motivos LDV y GRP de interacción con las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha X\beta 2$, respectivamente. La región CNP interactúa con la integrina $\alpha v\beta 3$. En VP4 se muestra el sitio de corte por tripsina y las subunidades VP8* y VP5* resultantes. En VP8* se localiza 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 interactúa con la proteína hsc70 (Tomado de López & Arias, 2004).

VP4 es indispensable para que rotavirus infecte a las células hospedera, ya que media la unión al receptor y la penetración a la célula. Para infectar, el virus depende del corte proteolítico de VP4 con tripsina (Fig. 3). Este corte no afecta la unión a la célula, pero es necesario para su acceso al citoplasma (Arias *et al.*, 1996, 2006). El mecanismo por el cual el corte con tripsina incrementa la infectividad viral se desconoce; sin embargo, se propone que la penetración del virus puede ser iniciada por los extremos recién generados ante el corte con tripsina (Fig. 3), o favorecido por el cambio conformacional de VP4 (Fig. 4).

Los dominios generados por el corte permanecen asociados físicamente en la partícula y exhiben importantes rearrreglos conformacionales durante la entrada (Dormitzer *et al.*, 2004). El corte de VP4 da lugar a dos subunidades:

a) VP8*. Comprende los residuos 1-231, incluyendo el dominio de hemaglutinación (unión a AS) localizado entre los residuos 93-208 (Fuentes-Panana *et al.*, 1995) (Fig. 3), aunque se propone la existencia de otras regiones funcionales aún no bien caracterizadas (Monnier *et al.*, 2006). Las tirosinas en posiciones 155 y 188, y la serina en posición 190, juegan un papel esencial en la hemaglutinación estableciendo los contactos directos con el sialósido (Dormitzer *et al.*, 2002, Isa *et al.*, 1997). VP8* constituye la región globular distal de las espículas de VP4, accesible a interacciones durante la entrada (Fig. 1).

b) VP5*. Comprende los residuos 248 a 776. Aquí reside la capacidad de interactuar específicamente en la superficie celular con integrinas (Zarate *et al.*, 2000), particularmente mediante la secuencia DGE presente en la posición 308-310 de VP5*, y una región que podría actuar como péptido de fusión entre membranas (coiled coil en Fig. 3). Se ha propuesto que VP5* pudiera interactuar, además, con la integrina $\alpha 4\beta 1$ a través de la secuencia IDA y contiene al péptido KID localizado entre los aminoácidos 642 y 658, que interactúa con la proteína Hsc70 (Coulson *et al.*, 1997, López & Arias, 2004; Perez-Vargas *et al.*, 2006). VP5* constituye la región alargada proximal a la cápside externa y en estrecha asociación con VP7 y VP6, se presume que en ella radican los cambios conformacionales más importantes durante la entrada (Fig. 4).

Cambios conformacionales de VP4 definen la interacción inicial con la membrana

Actualmente se alude a un modelo tectónico, en relación con las transiciones estructurales que operan sobre la estructura de los virus desnudos durante su entrada a la célula hospedera, como paralelo con los movimientos concertados y modulares que acontecen entre capas de la corteza de la tierra (Belnap *et al.*, 2000). En este modelo los cambios conformacionales operan de una manera interdependiente entre moléculas de la superficie de la célula y moléculas de la cápside del virión.

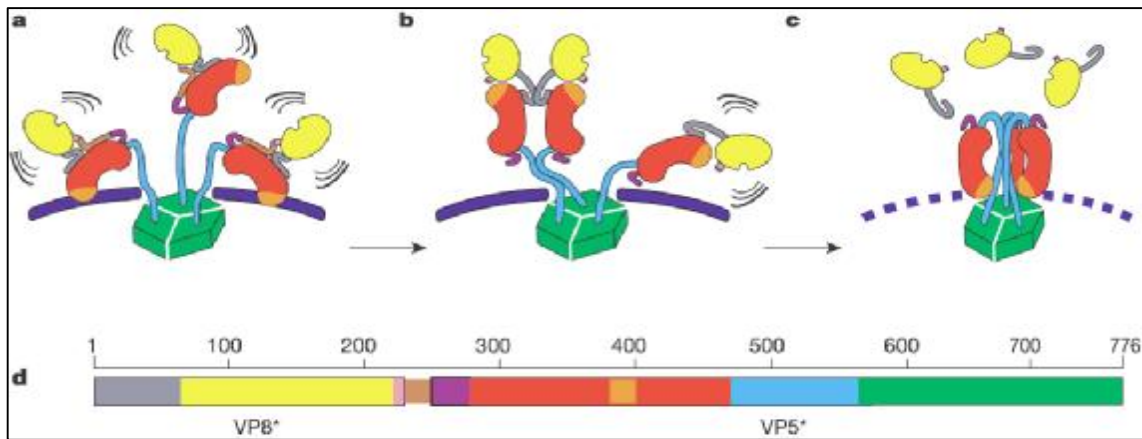


Figura 4. **Modelo tectónico de rearrreglos conformacionales de VP4 al contactar la célula huésped.** A) Estado previo al corte proteolítico. Las líneas representan la movilidad que exhibe la estructura, dos moléculas agrupadas constituyen las espículas visibles por criomicroscopía electrónica. La región globular distal (amarillo) es VP8* mostrando una hendidura para acomodar sialósidos. La región central de VP5* (rojo) media oligomerización y el motivo de interacción con la membrana se muestra en naranja. En azul y verde se ilustra el tallo que estabiliza la estructura en la región carboxilo terminal. B) Estado post-activación. C) Estado replegado, se presume que este se genera cuando se hacen los primeros contactos con moléculas de la superficie celular y se habilita la proteína para penetrar la membrana. La línea punteada indica el desensamblaje de la proteína VP7 durante la entrada del virus. D) Diagrama lineal de la codificación en color mostrada. Tomado de Dormitzer *et al.*, 2004. Nature 430:1053-1058.

Los eventos tempranos de interacción de rotavirus con sus receptores de membrana, sugieren que el virión interactúa exclusivamente a través de su proteína VP4, aunque VP7 se cree que cumple un papel modulador durante los eventos que vinculan esta fase con la de penetración a la célula (Ludert *et al.*, 2002; Isa *et al.*, 2008). Se presume que la activación proteolítica de VP4 regula estructuralmente las asociaciones entre los dímeros de esta proteína habilitándola para interacciones más estrechas con moléculas de la membrana celular (Fig. 3). El corte con tripsina permite que algunas regiones de VP5* sean accesibles para interacciones adicionales sobre la superficie de la membrana. En paralelo, el dominio VP8* en algunas cepas, a través de su unión a un sialósido de la membrana, facilita cambios conformacionales adicionales que dan lugar a la exposición de regiones del

dominio VP5* que le habilitarían para interacciones subsecuentes con receptores de penetración (Pesavento *et al.*, 2006; Yoder & Dormitzer, 2006).

Recientemente, Zárata y colaboradores (Zárata *et al.*, 2003) propusieron que los eventos iniciales de interacción con la membrana celular se encargan de inducir los re-arreglos conformacionales de VP5* para adquirir su forma competente para penetrar la membrana de la célula hospedera (Fig. 4). Es importante destacar que las cepas de rotavirus que no requieren hacer contacto con sialósidos para máxima infectividad, ya muestran variaciones conformacionales en sus dominios VP8* y VP5* que simulan los rearrreglos conformacionales propuestos para las cepas que si requieren esos contactos (López *et al.*, 2005; Monnier *et al.*, 2006; Yoder & Dormitzer, 2006). Condiciones experimentales como tratamientos con pH alcalinos y otros agentes desnaturalizantes sugieren además que estos cambios que acontecen luego del contacto con sialósidos y receptores post-unión tienen carácter irreversible y ello concuerda con los eventos esperados durante la penetración del virus a través de la membrana (Yoder & Dormitzer, 2006).

Es importante destacar la amplia variabilidad de fenotipos que exhiben distintas cepas de un mismo virus en lo que a las primeras interacciones con la célula se refiere. Rotavirus incluye cepas que dependen para infectar de una interacción inicial con sialósidos terminales (Fig. 5). Estas cepas han sido las más estudiadas estructuralmente y es en las que se basa el modelo de rearrreglos conformacionales antes discutido. Sin embargo, la mayoría de las cepas parecen no requerir el contacto con estos sialósidos terminales o bien usan sialósidos subterminales y de éstas apenas se comienza a entender su estructura (Blanchard *et al.*, 2007; Monnier *et al.*, 2006). Iniciativas recientes proponen la caracterización simultánea de ambos tipos de cepas con miras a elaborar un modelo más general de la entrada de rotavirus (Graham *et al.*, 2003; Isa *et al.*, 2008).

Los modelos de interacción de virus con su célula hospedera asumen que la entrada se compone de tres fases: unión, penetración y decapsidación. La unión inicial es un proceso reversible (de baja afinidad) y puede acontecer a bajas temperaturas pues se da a través de glicanos en el glicocáliz previo a la interacción con co-receptores o receptores de penetración que se encuentran más estrechamente asociados con la membrana plasmática y

por tanto exigen mayor fluidez y temperaturas fisiológicas para su función. La decapsidación debe acontecer durante su paso al citosol, para habilitar al virus en sus funciones replicativas intracelulares o subsecuentes eventos del ciclo infeccioso.

1.2 Patogénesis

Los virus que infectan epitelios encuentran células estrechamente asociadas lateralmente, polarizadas morfológica, fisiológica y bioquímicamente, definiendo dos regiones con dinámicas muy diferentes, las superficies apical (hacia el compartimiento luminal) y la región basolateral (hacia el compartimiento serosal). En presencia de una infección por rotavirus la enfermedad que se desencadena se manifiesta como diarrea, vómito y síntomas de involucramiento del sistema gastrointestinal principalmente. La diarrea por rotavirus es particularmente abundante y se debe a la replicación del virus en los enterocitos de las microvellosidades del intestino delgado.

La diarrea causada por rotavirus puede ser consecuencia de la combinación de varios de los siguientes factores:

1. La replicación del virus destruye los enterocitos maduros, lo que resulta en la pérdida de la capacidad de absorción de agua, sales y glucosa, y una disminución de las actividades de enzimas lactasas y sacarasas, con el consecuente aumento de osmolitos intraluminales, lo que produce una absorción disminuída y una secreción aumentada por carga osmótica (Morris & Estes, 2001).
2. El reemplazo de las células epiteliales maduras con los enterocitos inmaduros de las criptas intestinales, los que no son aún competentes en absorción, lo cual lleva a una pérdida adicional de agua y sales (Ciarlet & Estes, 2001).
3. Al menos en parte, la diarrea puede ser causada por la proteína no estructural NSP4, que estimula la secreción transepitelial de cloro, por una vía dependiente de calcio, lo que desequilibra el balance iónico de la célula y provoca la salida de agua. Aparentemente esto sucede previo a la destrucción del epitelio intestinal por la replicación viral. NSP4 es la

primera enterotoxina viral descrita (Horie *et al.*, 1999) y se ha propuesto que sus receptores celulares corresponden a integrinas del tipo alfa2 (Seo *et al.*, 2008).

4. También recientemente se ha involucrado al sistema nervioso entérico como responsable de inducir la salida aumentada de fluido y electrolitos de las células de las criptas intestinales (Ramig, 2004).

La mayoría de los estudios realizados sobre rotavirus se realizan en linajes de células epiteliales de origen renal o intestinal. Las células más utilizadas corresponden a la línea MA104 (originalmente células epiteliales de riñón de mono). Existe una gran controversia acerca de la capacidad de este linaje celular para exhibir propiedades de células epiteliales (Ciarlet *et al.*, 2001b), por lo cual la caracterización de la infectividad de rotavirus en sistemas *in vitro* que exhiban propiedades semejantes a las células polarizadas *in vivo*, requiere esfuerzos adicionales para dilucidar los mecanismos de la diarrea, que es el principal síntoma de la enfermedad atribuida a este virus.

1.3 Entrada a la célula blanco

La entrada de rotavirus a la célula se da por un mecanismo aún no bien conocido. A través del uso de microscopía electrónica, los primeros estudios propusieron que los rotavirus entran a la célula por endocitosis clásica (mediada por clatrina), o bien por penetración directa a nivel de la membrana plasmática. Recientemente se ha descrito que la cepa RRV de rotavirus entra a la célula por un proceso endocítico independiente de clatrina y de caveolas, el cual requiere de colesterol y de la función de una GTPasa conocida como dinamina. Este novedoso sistema de entrada está poco definido y hasta ahora se describe más bien en términos negativos (Sánchez-San Martín *et al.*, 2004). Sin embargo se ha demostrado que la cepa UK de rotavirus es endocitada a través del mecanismo clásico dependiente de clatrina (Gutierrez *et al.*, enviado).

En general, la interacción inicial de un virus con sus receptores celulares da lugar a una serie de eventos dinámicos que finalmente le permiten al virus entrar en el citoplasma de la célula. La interacción virus-receptor es en sí misma un proceso de varios pasos, pero

además, los virus pueden utilizar distintos receptores de manera secuencial, o bien un grupo diferente de ellos dependiendo del tipo celular que estén infectando. Se ha encontrado que virus de distintas familias utilizan cuando menos dos tipos de receptores para interactuar con su célula huésped: un receptor de unión, que generalmente le permite al virus anclarse de manera rápida a la superficie celular y un segundo tipo de receptores que le permiten la entrada a la célula, a estos receptores se les ha llamado co-receptores, receptores post-unión, de entrada, de fusión, de internalización o secundarios, dependiendo de la función que se conoce que tengan durante el proceso de infección del virus (Schneider-Schaulies 2000, López and Arias, 2006).

2 RECEPTORES CELULARES PARA ROTAVIRUS

2.1 Receptores de anclaje inicial (uso de glicanos)

El proceso de entrada de rotavirus ha sido caracterizado principalmente en células de epitelio de riñón de mono, MA104, que son susceptibles a la infección del virus. El contacto inicial de algunas cepas de rotavirus de origen animal con la superficie celular es mediado por la presencia de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico, SA), ya que el tratamiento de las células con neuraminidasa (NA), una enzima que lo corta, evita que estas cepas se unan a la superficie de la célula impidiendo así la infección (Fukudome, *et al.*, 1989). Estas cepas se conocen como sensibles a NA o dependientes de ácidos siálicos terminales (TSA+). En contraste, otras cepas de origen animal, y muchas aisladas de origen humano, son resistentes *in vitro* al tratamiento con NA (Ciarlet, *et al.*, 1999); sin embargo esto no significa que estas cepas no se unan a AS *in vivo*, ya que muchos estructuras de oligosacáridos que contiene AS son menos sensibles a NA o están menos accesibles (Delorme, *et al.*, 2001).

Reportes recientes destacan que el dominio VP8* de la proteína VP4 de la cepa de rotavirus humano Wa, interacciona con AS subterminal (internos a la estructura del oligosacárido), tales como los que se encuentran presentes en el gangliósido GM1, particularmente a través de sus residuos aminoacídicos S190 y R101. En este glicolípido se ha demostrado que los AS son resistentes al tratamiento con neuraminidasa (Blanchard *et al.*, 2008; Haselhorst *et al.*, 2009).

Las cepas que son NA-sensibles interactúan con un primer receptor en la membrana celular que contiene ácido siálico (AS), a través de la subunidad VP8* de la proteína VP4, en la región comprendida entre los aminoácidos 93 y 208, donde se sabe que algunos de estos residuos (R101, V144, Y155, K187, Y188, Y189 y S190) son esenciales para la unión con AS (Fig. 2) (Haselhorst *et al.*, 2009; Isa *et al.*, 1997).

Al observarse que las cepas que requieren AS corresponden a unos pocos aislamientos de especies animales, y que se pueden aislar variantes virales que ya no los necesitan (Méndez *et al.*, 1993), se propuso que este glicano no es indispensable para explicar las primeras interacciones de los rotavirus con la célula hospedera (Méndez *et al.*, 1993). El requerimiento de AS parece relacionarse más con la facilidad de crecimiento de los virus en cultivos celulares y correlaciona con el tipo de proteína VP4 que cada cepa contenga (Ciarlet *et al.*, 2002b). Estos datos sugieren que existe un receptor celular independiente de AS, que participaría después de esa interacción inicial en las pocas cepas que usan AS (Méndez *et al.*, 1996). Los datos generados en los últimos años sustentan esta idea (Arias *et al.*, 2002; Isa *et al.*, 2008; López & Arias, 2004).

Para las cepas que no dependen de AS terminales (TSA-), se han propuesto como posibles receptores varios glicoconjugados que contienen AS subterminales para los contactos iniciales con la membrana. Tal es el caso de los gangliósidos GM3 en el intestino de cerdos recién nacidos, o GM1 en células LLC-MK2 (Guo *et al.*, 1999 y Rolsma *et al.*, 1998). 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 NA.

En epitelios polarizados la distribución de glicanos es usada para direccionar proteínas a los distintos compartimientos subcelulares. Proteínas cuya localización sea normalmente apical, son glicosiladas postraduccionalmente y encaminados a la membrana por procesos celulares distintos a los usados por aquellas proteínas cuya distribución sea basolateral. Como resultado, en la cara apical de los epitelios se encuentran enriquecidos muchos tipos de glicanos, entre ellos los que contienen ácidos siálicos (Ulloa & Real, 2001). En particular, se ha descrito que los gangliósidos GM1 y GM3 son dirigidos principalmente a la cara apical de los epitelios (Cerejido *et al.*, 2004).

2.2 Receptores post-adhesión

En el modelo celular MA104, usando la cepa de rotavirus RRV, se ha reconocido que después de su primera interacción con AS, la proteína VP4 sufre un cambio conformacional que permite que el virus interactúe con la integrina $\alpha 2\beta 1$ a través del motivo DGE, comprendido entre los aminoácidos 308 y 310 en la subunidad VP5* (Fig. 3) (Zarate *et al.*, 2000). Se ha reportado que para las cepas NA-resistentes la integrina $\alpha 2\beta 1$ puede ser utilizada como un receptor de unión a la célula, sugiriendo esto que la integrina $\alpha 2\beta 1$ puede funcionar como receptor de unión o post-unión dependiendo de la cepa (Graham *et al.*, 2003, López *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta un corte transversal del epitelio intestinal multiestratificado, la integrina $\alpha 2\beta 1$ se distribuye apicalmente sobre enterocitos de las vellosidades inferiores (criptas), en forma basolateral a lo largo de las vellosidades (villus), y sobre células M a nivel del intestino delgado (Beaulieu *et al.*, 1992; Lussier *et al.*, 2000).

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.

El papel de las integrinas durante la entrada de rotavirus ha sido recientemente revisado (Isa *et al.*, 2009). El papel inicialmente propuesto como co-receptores de entrada ha sido mejor precisado a partir de experimentos de correlación entre el nivel de integrinas disponibles y la infectividad exhibida por las cepas RRV y WA hacia la línea celular MA104. La información sugiere que la importancia de las integrinas alfa2 y alfaVbeta3 podría ser menor de lo inicialmente descrito, al menos en lo que se deduce de datos de detección de infección mediante FACS (Isa *et al.*, 2009). La importancia de este tipo de moléculas es un excitante área de trabajo actualmente, sin embargo existen dificultades intrínsecas para llegar a conclusiones precisas debido a las múltiples funciones de estas proteínas y la naturaleza pleiotrópica de los efectos fisiológicos que las involucran.

Hsc70, es un miembro constitutivo de la familia de las proteínas de choque térmico hsp70, que se ha reportado se encuentra presente en la superficie de diferentes líneas celulares (Multhoff *et al.*, 1996, Guerrero *et al.*, 2002). Se ha encontrado que esta proteína participa en las primeras interacciones de los rotavirus en un paso posterior a la unión (Guerrero *et*

al., 2001). A pesar de que la proteína de choque térmico hsc70 no tiene una secuencia de señal de exportación, por citometría de flujo e inmunofluorescencia se detectó que está presente en la superficie de varias líneas celulares como BHK, Hep2, Caco y MA104 que son susceptibles a rotavirus (Guerrero *et al.*, 2002; Isa *et al.*, 2009; Multhoff *et al.*, 1996). Por ensayos de ELISA se ha demostrado la interacción de rotavirus con la proteína hsc70.

La información que sustenta la interacción de hsc70 con rotavirus se puede resumir en los siguientes puntos: i) Anticuerpos monoclonales dirigidos contra hsc70 bloquean la infección del virus y no la unión, pues cuando los anticuerpos se adicionan a las células después de que el virus se ha unido, son capaces de inhibir la infección del virus, y ii) La proteína recombinante hsc70 preincubada con el virus es capaz de inhibir la infección y no la unión del virus a la célula. Todo esto indica que la cepa RRV de rotavirus interactúa con la proteína hsc70 y esto ocurre en un paso posterior a la unión del virus con la célula huésped (Guerrero *et al.*, 2001; Pérez-Vargas *et al.*, 2006). La región de hsc70 con la cual interacciona rotavirus es a través de su dominio de unión a ligandos (Pérez-Vargas *et al.*, 2006).

Juntos todos estos resultados sugieren que la proteína hsc70 puede tener un papel activo en la infección de rotavirus, sirviendo no sólo de anclaje en la membrana celular durante el tránsito del virus al interior de la célula, sino ayudando también a su entrada a la célula, probablemente por la modificación conformacional de sus proteínas de superficie.

2.3 Modelo de entrada a su célula huésped

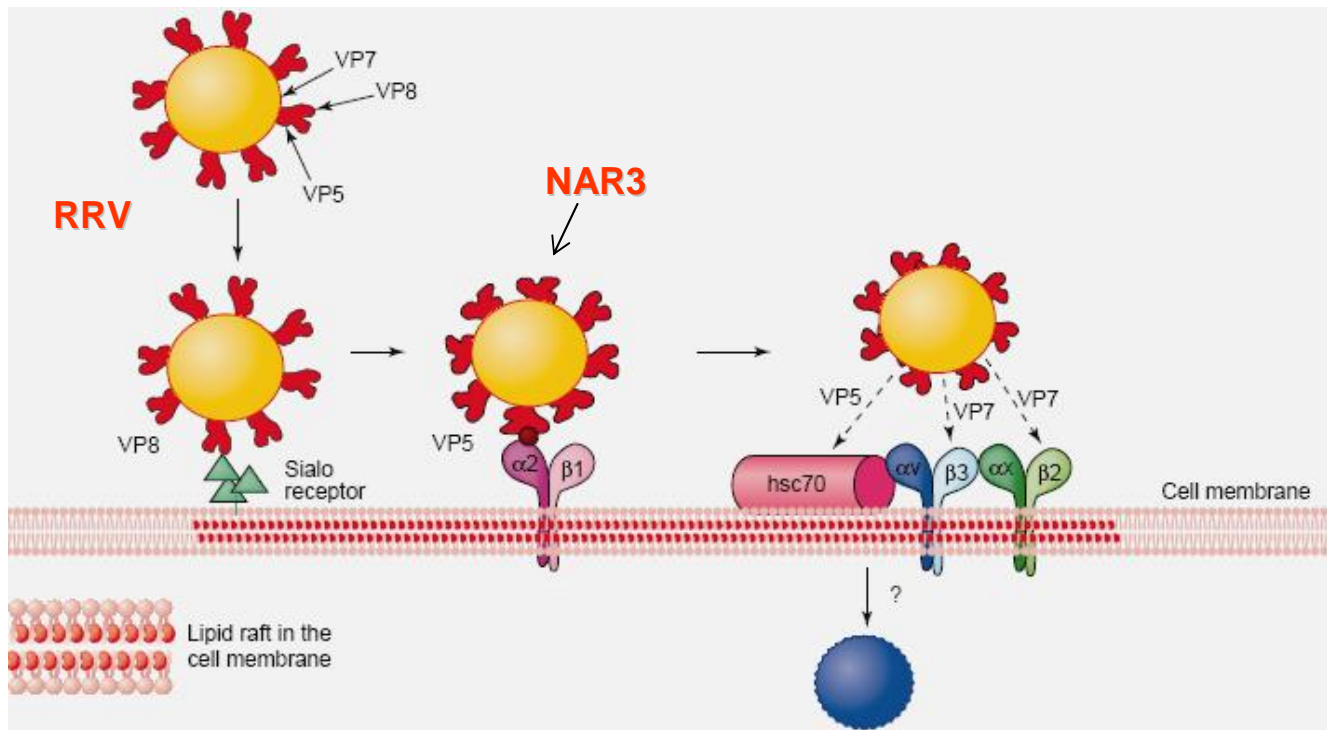


Figura 5. Modelo de entrada de rotavirus a su célula huésped. En células MA104 se muestran las interacciones iniciales, destacándose la dependencia de colesterol (que constituye los lipid rafts) tanto para la interacción con sus receptores (integrinas Alfa2Beta1, AlfaXBeta2 y AlfaVBeta3, proteína de choque térmico hsc70) como para la entrada del virus; se ilustra la interacción con ácido siálico a través de la proteína rotaviral VP8*, así como la capacidad de algunas cepas como NAR3 para interactuar directamente con co-receptores a través de su proteína VP5*. Modificado de López & Arias, 2004.

En lugar de una única molécula clave, el receptor celular para rotavirus podría ser un complejo de moléculas con una dinámica de membrana muy particular (Cuadras & Greenberg, 2003; Isa *et al.*, 2004), similar a la estructura descrita para las uniones intercelulares (Nusrat *et al.*, 2000). En este modelo existirían moléculas de unión inicial a VP8* (posiblemente glicoproteínas con AS terminal) y esta interacción induciría en el virus la exposición de regiones en VP5* previamente no accesibles que mediarían la interacción con co-receptores que lo habilitarían para la posterior penetración y decapsidación; luego

las partículas prodrían continuar a nivel intracelular y establecer una infección productiva (López & Arias, 2004).

Existen reportes de que muchas cepas de rotavirus dependen de integrinas para infectar y que esto podría reflejarse en su patogénesis, lo cual podría estar directamente vinculado con su tropismo hacia la membrana basolateral (Graham *et al.*, 2005; Isa *et al.*, 2009; Realpe *et al.*, 2010). Por ser los dos eventos más estudiados durante la entrada de rotavirus, el uso de AS terminal y la dependencia de integrinas se han propuesto como categorías de clasificación de cepas y se presume que se comportan independientemente (Graham *et al.*, 2006), sin embargo ambas correlacionan con el tipo de proteína VP4 que la cepa contenga (serotipo P) (Ciarlet *et al.*, 2002b; Graham *et al.*, 2004).

2.4 Rotavirus infecta células polarizadas de origen epitelial

Rotavirus es un patógeno que se transmite por la vía fecal-oral, por lo cual debe interactuar inicialmente con un epitelio para establecer una infección productiva. Entre los epitelios, la barrera intestinal es uno de los ambientes más complejos de los organismos metazoarios.

Los epitelios constituyen la frontera entre el organismo y el medio ambiente y en consecuencia regulan el intercambio de sustancias entre nuestro medio interno y el exterior. Asimismo, los epitelios presentan dos características fundamentales: 1) establecen uniones estrechas (TJ's, por sus siglas en inglés "Tight Junctions") que regulan el tránsito de iones y moléculas por el espacio intercelular y 2) están polarizados. Así, en la célula epitelial existen dos dominios estructural, fisiológica y bioquímicamente diferentes: el apical o luminal orientado hacia el medio externo y el basolateral dirigido hacia el compartimiento intersticial (Cerejido *et al.*, 2004; González-Mariscal *et al.*, 2009).

Debido a la distribución polarizada de acarreadores, canales, receptores y bombas en la membrana celular, los epitelios realizan el flujo transepitelial de iones y moléculas en forma vectorial (Cerejido *et al.*, 2004). Por debajo de la TJ's se localiza la unión adherente (AJ's, por sus siglas en inglés "Adherens Junctions"), los desmosomas y las uniones

comunicantes (UC). El conjunto de las cuatro estructuras forman el complejo de unión intercelular apical (AJC, por sus siglas en inglés ‘Apical Junction Complexes’) (Figura 6).

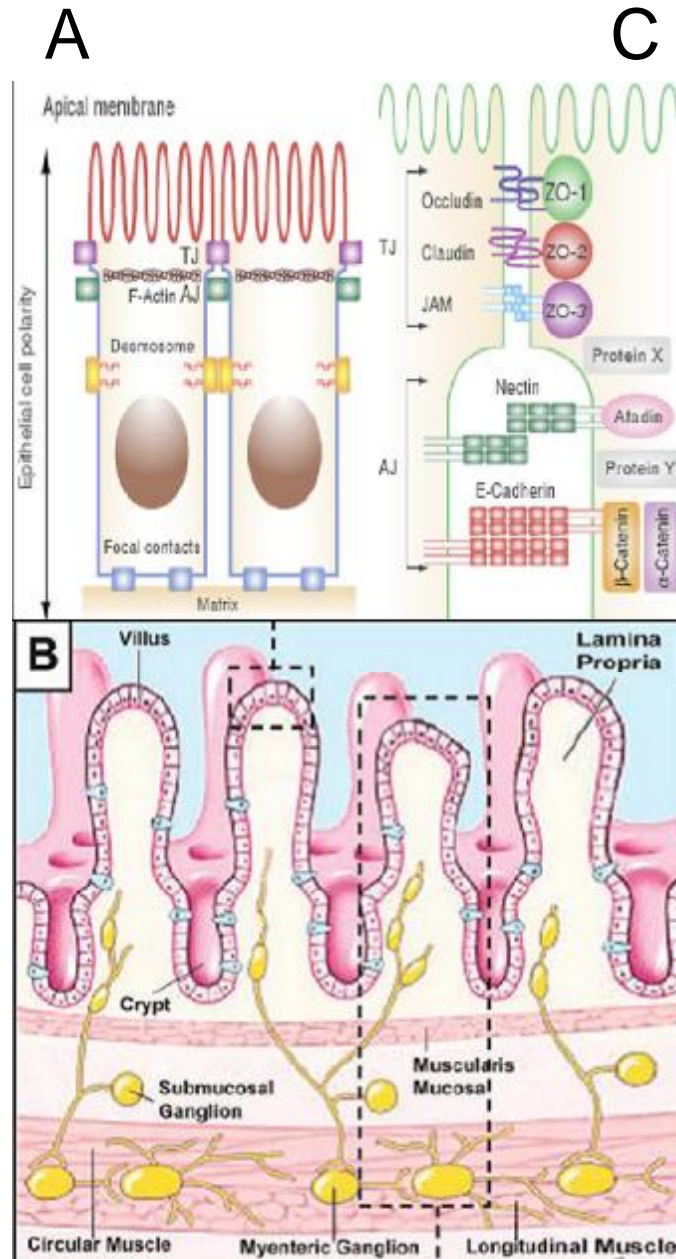


Figura 6. **Las células epiteliales están polarizadas.** A) Organización de las células epiteliales. Se esquematizan las diferentes regiones. B) En el epitelio intestinal están las microvellosidades (recuadro punteado) y las criptas conectoras. Este epitelio está recubierto de una monocapa de células epiteliales cuyo nivel de diferenciación aumenta conforme se acercan a la punta de la microvellosidad (recuadro punteado), donde coincide con el sitio donde infecta rotavirus. C) Esquema donde se ilustran los diferentes tipos de proteínas que conforman los complejos de adhesión apical (AJC, por ‘Apical Junction Complexes’). Estos se dividen en uniones estrechas o ‘Tight Junctions’ (TJ) y uniones adherentes o ‘Adherens Junctions’ (AJ). Nótese que varios de los componentes de esos complejos de unión son proteínas transmembranales.

Además de la función de compuerta al paso de iones y moléculas por la vía paracelular (GATE en inglés), las TJ's tienen una segunda función denominada de cerca (FENCE en inglés). Inmediatamente después de su biosíntesis, los lípidos y proteínas de membrana recién sintetizados, son dirigidos selectivamente desde la red trans-Golgi hasta los dominios apical o basolateral de la membrana plasmática. Una vez establecida la distribución asimétrica de los componentes de la membrana celular, ésta se mantiene por el anclaje al citoesqueleto de actina y porque las TJ's funcionan como cercas que restringen en el plano de la membrana, el movimiento de los lípidos y proteínas de la cara apical a la basolateral y viceversa, inclusive cuando las proteínas no están unidas al citoesqueleto de actina (Corvera *et al.*, 2000).

Lejos de ser un escenario estático, el mantenimiento de la barrera epitelial exhibe una dinámica intrínseca muy compleja. Se ha observado, por ejemplo, que una rápida reducción del colesterol inducida por metil- β -ciclodextrina genera una caída en la TEER (una medida de la comunicación iónica entre los compartimentos apical y basolateral) y un aumento del flujo paracelular de manitol, los cuáles son reversibles si se restauran las condiciones basales. Esto sugiere que las TJ's, a pesar de estar compuestas de proteínas, responden a cambios bruscos en la composición lipídica de la membrana (Nusrat *et al.*, 2000). En resumen, los eventos que pueden ocasionar cambios en la barrera epitelial pueden ser tan diversos como el tratamiento con fármacos que afectan globalmente la fisiología de epitelios como el intestinal, hasta infecciones altamente específicas que se dirijan a moléculas particulares entre los constituyentes de los complejos de adhesión intercelular (Sears, 2000).

Entre los numerosos reportes de patógenos entéricos afectando la barrera epitelial, se ha descrito que rotavirus puede interactuar directamente con las proteínas de las membranas laterales (Nava *et al.*, 2004). Además, en las células epiteliales la infección con rotavirus genera un aumento en la permeabilidad paracelular, una disminución de la RET y una relocalización de las proteínas del complejo de adhesión apical claudina-1, ocludina y ZO-1 (Dickman *et al.*, 2000; Estes & Morris, 1999; Obert *et al.*, 2000). La identificación de rafts

como mediadores importantes de la entrada de rotavirus (Isa *et al.*, 2004) y también de su salida (Chwetzoff & Trugnan, 2006 ; Cuadras *et al.*, 2006) ; además, de la descripción del complejo de adhesión apical como un tipo particular de raft (Nusrat *et al.*, 2000), sugieren la posibilidad de que rotavirus requiera para su entrada de los complejos de adhesión localizados en los bordes celulares, como recientemente se describió para el virus coxsackie (Coyne & Bergelson, 2006).

Se han descrito varios virus que afectan la polarización de las células por su dependencia de moléculas basolaterales para infectar epitelios, entre los más estudiados están coxsackievirus (Coyne & Bergelson, 2006), adenovirus (Walters *et al.*, 2002), y reovirus (Campbell *et al.*, 2005). En cada caso, se han reportado moléculas usadas por el virus para su unión inicial y que se localizan apicalmente, y co-receptores de entrada/penetración que se encuentran en la región basolateral (Bomsel & Alfsen, 2003). En dos de estos casos, así como en muchos otros virus, las integrinas modulan la infectividad de diversos modos. No obstante aún no es claro como un virus que accede por la superficie luminal del epitelio puede tener contacto con moléculas basolaterales para infectar.

Entre las proteínas virales propuestas como mediadores de la perturbación de la barrera epitelial, una proteína no estructural de rotavirus, NSP4, ha sido implicada exhibiendo efectos de perturbación de las funciones de las membranas laterales (Tafazoli *et al.*, 2001). Sin embargo, la relevancia de tal efecto puede estar más relacionada con la diarrea desencadenada por la infección de rotavirus, que con el proceso de entrada de estos patógenos.

Entre muchos otros patógenos entéricos, se considera que los virus no solamente usan receptores celulares específicos/únicos sino un conglomerado de moléculas de la célula. En algunos casos se ha podido reconocer mimetismos entre estos agentes y sus ligandos naturales, de tal suerte que la unión de los virus modifica a su favor la respuesta celular por señalización y consecuentemente acontece la entrada viral. En el contexto de receptores celulares para virus se puede ordenar su naturaleza química según la siguiente clasificación: (tomada de González-Mariscal *et al.*, 2009)

1) Oligosacáridos simples o compuestos que interaccionan con proteínas superficiales de los virus, las cuales pueden exhibir comportamiento tipo lectina.

2) Integrinas que son el sistema de anclaje de las células a su matriz extracelular y de ellas entre sí. Estas pueden ser reconocidas a través de motivos proteicos discretos como RGD, KGE, DGE, GPR, y LDV presentes en las proteínas virales.

3) Moléculas de adhesión intercelular, componentes de AJ's y TJ's, las cuales recientemente se perfilan como componentes críticos de las vías de entrada de los virus debido a su papel limítrofe entre compartimientos tisulares que son obstáculo para el tránsito de los patógenos y el establecimiento de infecciones productivas. (Tabla 1).

2.5 Los patógenos intestinales pueden perturbar la barrera epitelial

En varios casos se han descrito bacterias que exhiben mecanismos capaces de perturbar el complejo de adhesión apical y de esa forma atravesar epitelios. La mayoría de ellas son patógenas del aparato digestivo. Se pueden diferenciar dos grupos de acuerdo a como afectan la membrana lateral (Sears, 2000):

1) Mediante alteración del citoesqueleto de actina.

Vibrio cholerae que produce una enterotoxina llamada ZOT (Zonula Occludens Toxin), que aumenta la permeabilidad intestinal y destruye a los filamentos de la TJ. Además *Escherichia coli* enteropatogénica, que induce una disminución de la RET e incrementa el flujo paracelular de manitol.

2) Mediante modificación o degradación de proteínas de la TJ.

Vibrio cholerae que produce una metaloproteasa llamada hemaglutinin/proteasa (H/P), que rompe en dos fragmentos a la ocludina. *Shigella flexneri* que produce una toxina que desfosforila a la ocludina y desplaza a la claudina 1 de la fracción insoluble en Tritón X-100 a la fracción soluble en el detergente.

Tabla 1. Virus que utilizan proteínas de las AJC como receptores celulares. (Tomado de González-Mariscal *et al.*, 2009. *Frontiers in Bioscience* 14:731-768).

Virus	Familia	Género	Proteína Viral	Receptor Celular	Localización Receptor	Tropismo Viral	Enfermedad Relacionada
Coxsackie	Picornaviridae	Enterovirus	VP1, VP2 and VP3	CAR	TJ	GI tract, heart, brain pancreas	Bornholm, myocarditis, pericarditis, aseptic meningitis, Diabetes Mellitus type 1
Swine vesicular disease virus	Picornaviridae	Enterovirus	ND	CAR	TJ	GI tract	Swine vesicular disease
Poliovirus	Picornaviridae	Enterovirus	VP1	ncl-5	AJ	GI tract, blood, motor neurons of the spinal cord, brain stem or motor cortex	Poliomelitis
Adenovirus	Adenoviridae	Mastadenovirus	Fiber	CAR	TJ	Respiratory and GI tract	tonsillitis, croup, bronchiolitis, pneumonia, conjunctivitis, gastroenteritis, meningitis, encephalitis, myocarditis
Reovirus	Reoviridae	Orthoreovirus	$\sigma 1$	JAM-A	TJ	Respiratory and GI tract	Asymptomatic in most mammals including humans
Rotavirus		Rotavirus	Vp8	ND	ND	GI tract	Diarrhea
Feline Calicivirus	Caliciviridae	Vesivirus	ND	JAM-A	TJ	Respiratory tract	Respiratory infections and polyarthritis in felines
HSV-1	Herpesviridae	Simplexvirus	gD	Nectin-1	AJ	Mouth lips, cornea, sensory and autonomic neurons	Lip cold sores, Keratitis
HSV-2	Herpesviridae	Simplexvirus	gD	Nectin-1, nectin-2	AJ	Genitals, sensory and autonomic neurons	Genital Herpes
Pseudorabies	Herpesviridae	Varicellovirus	gD	Nectin-1, nectin-2, ncl-5	AJ	Respiratory tract, cranial nerves, reproductive organs	Pseudorabies or Aujeszky's disease
Bovine Herpes 1	Herpesviridae	Varicellovirus	gD	Nectin-1, ncl-5	AJ	Genitals, eye conjunctive, upper respiratory tract	Rhinotracheitis, Conjunctivitis, Genital infections, Shipping fever
HCV	Flaviviridae	Hepacivirus	ND	Claudins -1, -6 and -9	TJ	Liver, blood	Chronic hepatitis C, Liver cirrhosis, Liver cancer

La enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE) que a través de su extremo carboxilo terminal se une específicamente a las claudinas 3 y 4 y las degrada. La micotoxina Ocratoxina A, que degrada a las claudinas 3 y 4, produce efectos similares a los observados con CPE.

Como se mencionó en la sección anterior, las moléculas de los complejos de unión intercelular pueden constituir blancos de entrada de los virus a los epitelios que infectan. Dos de los casos mejor estudiados corresponden a adenovirus y coxsackie-virus, los cuáles se anclan a la membrana celular a través de su interacción con la proteína CAR (Coxsackie Adeno Receptor), una proteína del complejo de adhesión apical (Cohen *et al.*, 2001). El otro caso es reovirus, que se une a las células epiteliales a través de la interacción de su

proteína knob con una molécula conocida como JAM (Junction Adhesion Molecule), la cual también constituye parte del complejo de adhesión apical (Barton *et al.*, 2001).

Se considera que rotavirus puede perturbar la integridad epitelial como estrategia de patogénesis (Nava *et al.*, 2004); esto cobra particular importancia en la descripción de la infectividad de este virus hacia linajes celulares que exhiben polarización *in vitro*. Teniendo en cuenta la alta dependencia de sialósidos terminales para sus interacciones iniciales con la membrana celular, la cepa RRV ha sido clave para vincular las observaciones de infectividad de rotavirus hacia células polarizadas y los eventos tempranos de las interacciones con receptores celulares.

La descripción por parte de Svensson y colaboradores (Svensson *et al.*, 1991) de que la cepa de rotavirus RRV infectaba células Caco-2 en forma simétrica, es decir, la infección era igualmente eficiente ya sea que el virus se adsorbiera desde la superficie apical o basolateral de la monocapa celular, lleva a pensar que la interacción de rotavirus con células polarizadas podría ser clave en el conocimiento de su patogénesis. Sin embargo, otro reporte de estudios encaminados a evaluar la polaridad de infección concluyeron que esta cepa infectaba de manera asimétrica en varios linajes celulares probados (Ciarlet *et al.*, 2001b). El mismo reporte destacaba que no sólo esta cepa, sino todas las que se probaron y eran sensibles a tratamiento con NA, sólo infectaban eficientemente desde la superficie apical. En forma complementaria el mismo trabajo concluyó que aquellas cepas sensibles a tratamiento con NA infectaban igualmente bien desde cualquiera de los dos compartimientos y esto correlacionaba con la desigual riqueza de glicanos entre las superficies apical y basolateral.

En vista de la importancia de conocer la capacidad que tiene rotavirus para infectar células polarizadas, para entender su patogénesis y así poder interponer estrategias de control efectivas, se planteó este trabajo con el objeto de buscar correlación entre el uso de sialósidos terminales y la dependencia de integrinas en cultivos de células que se polarizan espontáneamente en cultivo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Caracterizar los eventos iniciales de infección de rotavirus en células polarizadas MDCKII

3.2 Metas Específicas

1. Evaluar la polaridad de infección de cuatro cepas de rotavirus que difieren en su sensibilidad a tratamiento con neuraminidasa y en la dependencia de integrinas, en células MDCKII cultivadas en soportes permeables. Las cepas a evaluar son Wa, UK, TFR41 y RRV.
2. Evaluar la importancia de moléculas de distribución basolateral en la infección de células MDCKII polarizadas por parte de las mismas cuatro cepas de rotavirus.
3. Evaluar la dependencia de las integrinas alfa2beta1 y alfaVbeta3 para la infección por parte de las mismas cuatro cepas de rotavirus.

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 Células y virus.

La línea celular MDCK (MADIN and DARBY, Jr., 1958) se obtuvo de la American Type Culture Collection (MDCJ, CCL-34). Las células entre los pasajes 20 y 80 se sembraron en botellas desechables (Costar 3150, Cambridge, MA) y se mantuvieron en una incubadora (Forma Scientific 3158, Ohio, USA), a una temperatura de 37 °C y con 5% de CO₂. Las células MDCKII y MA104 (epitelio de riñón de mono) se cultivaron en medio Advanced D-MEM suplementado con 3.0% de suero fetal bovino. El desarrollo de la polaridad de MDCKII cultivadas en soportes permeables se monitoreó midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) con un voltímetro epithelial (Nava *et al.*, 2004). Las cepas de rotavirus usadas fueron Rhesus rotavirus Si/RRV (P5B[3] G3), su variante NAR que se reportó previamente (Mendez *et al.*, 1993); rotavirus porcino, Po/TFR41 (P9[7] G5), rotavirus bovino Bo/UK (P7[5] G6); rotavirus humano Hu/Wa (P1A[8] G1). Las cepas se seleccionaron basados en el modelo de uso de SA terminal e integrinas descrito en células MA104 (Graham *et al.*, 2003).

Para establecer cultivos polarizados de células MDCKII, estas se sembraron a densidades de 50.000 células por filtro, en membranas de poliéster con 6.5 mm de diámetro y tamaño de poro de 0.4 μm o 3.0 μm según el experimento (Transwells Corning-Costar). El desarrollo de la polarización se monitoreó con un voltímetro epitelial EVOM (WPI, Sarasota, CA, USA) y solo se usaron monocapas que alcanzaran valores superiores a 500 ohms.cm².

4.2 Anticuerpos y reactivos

Los sueros policlonales para la detección de infección por rotavirus fueron producidos en el laboratorio como se describe en Guerrero y colaboradores (Guerrero *et al.*, 2002) y se demostró que reconoce todas las proteínas del virus. Anticuerpos de conejo para la detección de Ocludina y ZO1s fueron comprados de Zymed (San Francisco, CA, USA). Anticuerpos monoclonales para la detección de lamina A/C se compraron de Santa cruz Biotechnology (Santa cruz, CA, USA). Anticuerpos secundarios conjugados a Alexa 488 y

DAPI fueron comprados de Molecular probes (Eugene, OR, USA). Anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano se adquirieron de Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA, USA). Todos los demás reactivos se compraron de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

4.3 Ensayos de infectividad.

La infectividad de las preparaciones virales se probó mediante un ensayo de detección de focos mediante tinción y revelado por inmunoperoxidasa (Guerrero et al., 2000a). El virus se tituló en células crecidas en cajas de 96 pozos para cultivo de las células MA104 o MDCKII. 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 de conejo anti-rotavirus por 1 hr. Se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo acoplado 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 unidades formadoras de focos (FFU) que hay por ml de lisado.

4.4 Infección en soportes permeables.

Se evaluó la polaridad de infección considerando la limitación al flujo de virus a través del soporte. Se estimó que alrededor del 25 % del virus alcanza a pasar en ausencia de células en soportes de 3.0 μm de diámetro de poro. Igual dilución de lisado viral se adsorbió en cada superficie de las monocapas cultivadas en los soportes permeables durante 1 hr a 37°C, a nivel apical se usó un volumen de 100 μl y basolateral 500 μl ; posteriormente se lavó dos veces con medio sin suero y se dejó proceder la infección por 12-14 hrs, luego de lo cual se detectó la infección en la manera descrita arriba.

4.5 Tratamiento de células y virus.

Para remover los ácidos siálicos terminales de la superficie celular, las monocapas de células MA104 se trataron durante 1 hr a 37°C con 20 U de neuraminidasa de *Arthrobacter ureafaciens* adquirida de Sigma-Aldrich, en el caso de células MDCKII se usaron 80 unidades. Posteriormente se lavaron las monocapas con medio sin suero y se infectó en la manera descrita arriba.

Para bloquear la infectividad del virus con glicoforina (Sigma-Aldrich), las preparaciones virales se preincubaron con la proteína a una concentración de 100 ug/ml durante 1 hr a 37 °C, antes de adsorber los virus a las monocapas de células. Los resultados se expresan como porcentaje del número de unidades formadoras de focos encontrados en los controles sin tratamiento.

4.6 Tratamiento con EGTA.

Usando condiciones de siembra y tiempos incubación idénticos a los usados en soportes permeables (donde se puede demostrar polarización mediante el registro de desarrollo de resistencia transepitelial), se detectó mediante tinción de ZO1 en soportes impermeables (plástico de cultivo y laminillas de microscopía) el eficiente desarrollo de polarización y se procedió a realizar tratamientos sobre las monocapas asumiendo un nivel de polarización equiparable al alcanzado en soportes permeables (Transwells).

Monocapas bien apretadas de MDCKII se pre-trataron con 2 mM EGTA a 37 °C durante 5-10 min, posteriormente se lavaron y se adsorbieron los lisados virales durante 30 min, se lavó dos veces y se dejó proceder la infección por 8 horas. Los focos infecciosos fueron detectados mediante inmunofluorescencia (ver debajo) y contra-tinción de núcleos con DAPI.

4.7 Unión de virus a la membrana celular

Las monocapas de MDCKII se preincubaron con 1% BSA antes del tratamiento con EGTA, se lavó con el mismo medio de bloqueo frío y se adsorbió cada lisado en frío por 30 min; se removió el inóculo y se lavó 3 veces con medio sin suero frío, antes de resuspender en

buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH. 7.5, 150 mM NaCl; 0.1 % Triton X-100). El virus fue liberado por descongelación dos veces y se detectó por ELISA (Zárate *et al.*, 2003).

4.8 Silenciamiento de la expresión de integrinas.

siRNA's específicos para las subunidades alfa2 y beta3 fueron seleccionados mediante alineamiento de secuencias y se mandaron a sintetizar en Dharmacon Reseatrch (Lafayette, CO, USA), cada uno de ellos se transfectó 12-16 horas a una concentración de 600 nM y se esperó 48 hrs antes de infectar las células. Las secuencias corresponden a la región 151-172 de la integrina alfa2 canina y 187-207 de la integrina beta 3 también de perro. Se usó como control un siRNA irrelevante dirigido hacia el gene de la luciferasa (López *et al.*, 2004). Para la transfección se usó lipofectamina y se dejaron entre 14-16 hrs a 37 °C en incubación, luego de lo cual se lavaron y se esperó 48 h en incubación antes de utilizar las monocapas para ensayos posteriores.

4.9 Inmunofluorescencia

Las células crecidas sobre cubreobjetos en cajas de 12 ó 24 pozos y las monocapas sembradas sobre cubreobjetos o Transwells® (Costar) se fijaron con paraformaldehído al 2% en solución amortiguadora de fosfatos (PBS), pH 7.4 durante 15 minutos a temperatura ambiente. En seguida se permeabilizaron durante 5 minutos con Tritón X-100 al 0.25% disuelto en PBS-1% BSA-50 mM NH₄Cl seguido de 4 lavados con solución de lavado. En los casos en que se especifica, las monocapas se fijaron con metanol al 100% ó etanol al 95% a 4 °C durante 30 minutos. Para bloquear la interacción inespecífica con los anticuerpos las células se incubaron con albúmina sérica bovina (BSA) libre de IgG al 1% (Sigma, USA) por una hora a temperatura ambiente.

Después de lavar, se agregó el anticuerpo primario deseado en PBS-1% BSA-NH₄Cl 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.

Después de la incubación con el anticuerpo secundario, las monocapas se lavaron repetidamente con PBS y finalmente con agua destilada para eliminar el exceso de

anticuerpo. Las preparaciones se montaron con Fluoprep® (Biomerioux, Francia) sobre portaobjetos limpios para evitar al máximo la disminución en la fluorescencia. La fluorescencia de las monocapas se observó en el microscopio confocal.

Las muestras se analizaron en microscopio de fluorescencia Axioskop mot plus, Zeiss y software Image Pro Plus 5.0.2.9 y Adobe Photoshop 7.0, en donde se menciona algunas muestras también fueron observadas en microscopio confocal LSM 510 marca Zeiss y se analizaron mediante el software Image J 1.32j y el programa incluido con el equipo confocal.

En monocapas cultivadas en soportes permeables se capturaron imágenes de cortes en la misma dirección del plano de las células, cortes perpendiculares a ese plano en dirección axial (x-y) y cortes perpendiculares en dirección sagital (x-z), con el fin de mostrar citoplasma y membranas periféricas tanto apical como basolateral. Se realizó proyección y empalme de todos los cortes obtenidos.

CAPITULO II

5 RESULTADOS

Los resultados principales de este proyecto se encuentran consignados como artículo original de investigación y se incluye en su versión original, en inglés, a continuación:



Rotaviruses require basolateral molecules for efficient infection of polarized MDCKII cells

Mauricio Realpe¹, Rafaela Espinosa, Susana López, Carlos F. Arias*

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos CP 62210, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2009
Received in revised form 9 November 2009
Accepted 13 November 2009
Available online 20 November 2009

Keywords:

Rotavirus
Polarized infection
MDCK
Integrins
Sialic acid

ABSTRACT

In this work we evaluated the ability of rotavirus strains with different receptor requirements to infect the apical and basolateral surfaces of polarized MDCKII cells. We used neuraminidase (NA)-sensitive (RRV and TFR-1) and neuraminidase-resistant (Wa and UK) viruses that differ in their use of integrins. Regardless of their receptor requirements, all virus strains tested were found to efficiently infect cells from both membrane surface domains, with preference for the basolateral domain, since: (i) disruption of tight junctions of polarized cell monolayers by calcium chelation led to a reversible increase of rotavirus infectivity, (ii) the viruses infected preferentially the cells located at the borders of microcolonies of polarized cells, and (iii) in cells grown on a permeable support all four virus strains were able to start the infection by either plasma membrane domain. Preferential infection (5–11-fold more efficiently) of the basolateral surface correlated with the neuraminidase resistance of the virus strains, but not with their requirement for integrins, which in MDCKII cells seem to be used by all four viruses. The infection of both cell surface domains by RRV was found to depend on the presence of terminal sialic acids, since its infectivity was reduced by neuraminidase treatment of the cells and it was also blocked by incubation of the virus with glycoprotein A. The efficient infection through the basolateral membrane surface of polarized cells might be relevant for the pathogenesis of rotavirus, especially given the recent reports of antigenemia and extraintestinal spread of the virus in children and animal models.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Rotaviruses are the leading etiologic agent of viral gastroenteritis in infants and young children worldwide, being responsible for about 600,000 deaths every year (Parashar et al., 2006). The primary target for these viruses is the mature enterocytes of the villi of the small intestine (Ciarlet and Estes, 2001). However, recent findings indicate that the tropism of rotaviruses *in vivo* might be broader than previously thought. Rotavirus antigen has been found in the serum of children, mice, rabbits, calves, rats, and pigs, and viremia has been reported in rats, mice, and pigs (Azevedo et al., 2005; Blutt et al., 2003; Crawford et al., 2006), indicating that extraintestinal spread of the virus may occur.

Rotaviruses are non-enveloped viruses formed by three concentric layers of protein. The outermost layer of the virion is formed by two proteins, VP7 and VP4. These proteins constitute the smooth

surface and protruding spikes of the virion, respectively. VP4 is involved in receptor binding and cell penetration, while VP7 seems to contribute to virus entry by interaction with cell receptors at a post-binding step (López and Arias, 2004). After binding to the cell surface the virus penetrates the plasma membrane to productively infect the cell. This penetration depends on the trypsin treatment of the virus resulting in the specific cleavage of VP4 to polypeptides VP8 and VP5 (Arias et al., 1996; Espejo et al., 1981; Estes et al., 1981).

The initial interaction of some rotavirus strains with the cell surface is through N-acetylneuraminic acid, also known as sialic acid (SA). The infectivity of these strains is diminished by treatment with neuraminidase (NA), and therefore they are named NA-sensitive (Isa et al., 2006).

In contrast, the infectivity of many animal rotavirus isolates and most strains isolated from humans is resistant (Ciarlet and Estes, 2001), and these strains are characterized as NA-resistant (Isa et al., 2006). However, it was recently suggested that the NA-sensitive viruses interact with terminal sialic acids (TSAs), which are susceptible to NA treatment, while NA-resistant viruses might bind to subterminal SA that are known to be resistant to NA treatment (Delorme et al., 2001; Guo et al., 1999; Haselhorst et al., 2009; Isa et al., 2006).

* Corresponding author. Tel.: +52 777 3114701; fax: +52 777 3172399.

E-mail address: arias@ibt.unam.mx (C.F. Arias).

¹ Current address: Departamento de Investigación y Desarrollo, Boehringer-Ingelheim Vetmedica, Calle 30 #2614, Zona Industrial, Guadalajara 44940, Mexico. Tel.: +52 33 3668 7553.

After the initial interaction of the virus with the cell surface, most probably with SAs present in gangliosides (Delorme et al., 2001; Guo et al., 1999; Rolsma et al., 1998), several other molecules have been implicated in rotavirus cell entry, including integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha x\beta 2$, and $\alpha 4\beta 1$, and the heat shock cognate protein 70 (Coulson et al., 1997; Guerrero et al., 2000b, 2002). More recently, the characterization of viral strains whose infectivity is not inhibited by anti-integrin antibodies suggested the existence of rotavirus strains that are integrin-independent. These strains were mostly of porcine origin, and it was found that integrin usage related to VP4 serotype, independently of sialic acid usage (Graham et al., 2003).

In epithelial and endothelial cells integrins have a polarized distribution and localize at the basolateral plasma membrane (Schoenenberger et al., 1994). Therefore, rotaviruses reaching the intestinal epithelium from the luminal side or being in contact with the apical surface of confluent epithelial cell lines would find their integrin receptors hidden beneath tight junctions (TJs), on the basolateral surface. Despite this observation and the fact that the primary target of rotaviruses *in vivo* is the polarized intestinal epithelium, most studies have been carried out in non-polarized cultures of embryonic African green monkey kidney (MA104) cells since these cells are highly permissive to rotavirus infection.

Two studies have evaluated the ability of rotaviruses to infect the apical and basolateral domains of polarized cells in culture, which resemble more closely polarized epithelia (Vogelmann et al., 2004), with conflicting results (Ciarlet et al., 2001, Svensson et al., 1991). The earlier study concluded that the NA-sensitive simian rotavirus strain RRV infects adenocarcinoma intestinal Caco-2 cells in a symmetric manner, i.e., with the same efficiency via both the apical and basolateral surfaces (Svensson et al., 1991). On the other hand, Ciarlet et al. (2001), using a panel of polarized cell lines, including Caco-2 cells, reached the conclusion that NA-sensitive viruses infect efficiently only through the apical cell surface, whereas NA-resistant viruses infect equally well both sides of the polarized cell monolayers. Since the methods used and the results obtained differed in those studies, determination of rotavirus infection polarity is still not well defined.

Given the ability of rotavirus to spread extraintestinally and infect intestinal cells via blood vessels (Azevedo et al., 2005), it becomes important to define the capacity of rotavirus strains with different receptor requirements to infect the apical and basolateral surfaces of polarized epithelia. In this study we used NA-resistant and NA-sensitive viruses that differ in their use of integrins. Our results indicate that regardless of their neuraminidase sensitivity or their reported requirement for integrins, all four rotavirus strains tested efficiently infect both surfaces of polarized MDCKII cells, with a preference for the basolateral domain. The efficient infection of both the apical and basolateral surfaces by the NA-resistant virus RRV was found to depend on the presence of TSA, and all rotavirus strains studied seemed to require integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha \nu\beta 3$.

2. Materials and methods

2.1. Cells and viruses

Rhesus monkey MA104 and Madin-Darby canine kidney cells (MDCKII, kindly provided by Dr. L. Gonzalez-Mariscal, Cinvestav, Mexico DF), both of epithelial origin, were grown in Advanced Dulbecco-modified Eagle's minimum essential medium supplemented with 3% fetal bovine serum; cells were passed twice weekly and maintained at 37 °C in a 10% CO₂ humid atmosphere. Polarized monolayers of MDCKII cells were grown on permeable supports.

6.5 mm-diameter polyester filters with a 0.4 or 3.0 μm pore size (Transwells, Corning, Costar, USA) were seeded with about 50,000 cells per filter and the Trans-Epithelial Electrical Resistance (TEER) was monitored with an epithelial voltohmmeter (WPI, Sarasota, CA, USA). Monolayers with a TEER above 500 Ωcm^2 were used in all assays; permeable supports with either pore-size gave rise to monolayers with high TEER values under the same culture conditions. All rotavirus strains were propagated in MA104 as previously described (Guerrero et al., 2000a). Rhesus rotavirus Si/RRV (P5B[3]G3) and human rotavirus Hu/Wa (P1A[8]G1) were obtained from H.B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA), the porcine rotavirus strain, Po/TFR-41 (P9[7]G5) was kindly provided by I. Holmes (University of Melbourne, Australia), bovine rotavirus Bo/UK (P7[5]G6) was provided by D.R. Snodgrass (Moredun Research Institute, Scotland); the nar3 variant of RRV has been previously described (Méndez et al., 1993).

2.2. Antibodies and reagents

The rabbit anti-rotavirus polyclonal serum raised against purified RRV triple-layered particles was produced in our laboratory, as described (Guerrero et al., 2002), but using 100 μg of purified virus per injection. The serum raised had antibodies to all structural rotavirus proteins, as evaluated by Western blot analysis. Rabbit polyclonal antibodies to occludin and ZO-1 were obtained from Zymed (San Francisco, CA). Monoclonal antibody IgG_{2b} to LamA/C was obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Alexa-488-conjugated secondary antibodies and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibody was from Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA). Trypsin was obtained from GIBCO (1:250; Cat. #27250-018). All other reagents were from Sigma–Aldrich (MO, USA).

2.3. Infectivity assays

The infectivity of the viral preparations was evaluated by an immunoperoxidase focus detection assay (Guerrero et al., 2000a). Briefly, confluent MA104 or MDCKII cells grown in 96-well plates were washed with serum-free MEM, and serial 2-fold dilutions of the viral lysate (previously activated with trypsin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, for 30 min at 37 °C) were adsorbed to the cells for 60 min at 37 °C. Conditions were adjusted, depending on the cell line and the virus strain, to count about 150 foci per well in control experiments. After the adsorption period, the virus inoculum was removed, the cells were washed once, serum-free MEM was added, and the infection was left to proceed for 12–14 h at 37 °C. Infected cells were then detected using a rabbit hyperimmune serum to rotavirus, and a secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody. The peroxidase focus-forming units (ffu's) were counted with the help of a Visiolab 1000 station (Biocom, France) as previously reported (Guerrero et al., 2000b). The polarity of rotavirus infectivity in polarized MDCKII cell monolayers was evaluated in transwells with filters having 3 μm pores. The virus dilution used to infect the apical and the basolateral surfaces of the cell monolayer was the same. For the adsorption period 100 or 600 μl of virus cell lysates were added to the apical or basolateral sides, respectively, and the cells were incubated for 1 h at 37 °C. The filters were then washed twice with MEM and the infection was left to proceed for 12–14 h, and processed as described above.

2.4. Cells and virus treatments

To remove terminal sialic acids (TSAs) from the cell surface, monolayers of MDCKII cells were treated with 80 mU/ml of *A. ureafasciens* neuraminidase (Sigma–Aldrich) for 1 h 37 °C before

infection. To block virus infectivity with glycoprotein A (gphA) (Sigma–Aldrich) the sialylglycoprotein, at 100 µg/ml, was pre-incubated with viral cell lysates for 1 h at 37 °C before adsorption of the virus to the cell monolayer. Viral infectivity under the different conditions tested is reported as the percentage of ffu's present in untreated infected cells. At least 100 foci were counted per treatment. To prepare double-layered particles, aliquots of semi-purified RRV virus were incubated with 50 mM EDTA for 30 min at 37 °C (Cuadras et al., 1997), and the EDTA-treated virus was pelleted by centrifugation for 1 h at 40,000 rpm in an SW50 Beckman rotor to remove the virus outer capsid proteins. The removal of these proteins was assessed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining of the treated viral particles, and the titer of the EDTA-treated virus was determined as described above.

2.5. EGTA treatment assay

Since polarity of MDCKII cells can only be demonstrated for cell monolayers in permeable supports (by measuring the transmembrane resistance), we performed ZO-1 staining (Nava et al., 2004) as indicative of the degree of polarization of these cells, and used similar conditions (seeding cell densities and times of growth) for reaching polarized monolayers in different growth supports. Thus, highly confluent (3 or more days) MDCKII cells grown on glass coverslips or 96-well plates were washed with serum-free MEM and then treated with 2 mM EGTA at 37 °C for 5–10 min, gently washed twice, and then infected as mentioned above, except that the viral cell lysate was adsorbed for 30 min. The infection was left to proceed for 8 h and the infectious foci were detected by an immunofluorescence assay as described (Sánchez-San Martín et al., 2004). Briefly, the cell monolayers were fixed with methanol, blocked with blocking buffer (1% BSA, 50 mM NH₄Cl in PBS), and incubated with a primary rabbit hyperimmune serum to rotavirus (diluted 1:2000), and then with Alexa 488-coupled anti-rabbit antibodies diluted in blocking buffer; extensive washes were included after each antibody incubation step. DAPI counterstaining (5 µg/ml) of nuclei was included with the secondary antibody incubation. The coverslips were then mounted on glass slides with Fluoprep (BioMérieux, Fr.), and the anti-fading agent DABCO (100 mg/ml; Sigma–Aldrich St Louis, Mo). The slides were analyzed with a Zeiss Axioskop II imaging microscope and images were digitally captured with Image Pro Plus (Media Cybernetics, MD, USA) and edited with Adobe Photoshop software.

2.6. Binding assay

Binding of virus to cell monolayers was evaluated as previously described (Zárate et al., 2003). Highly confluent MDCKII cells grown on plastic 48-well plates were washed with serum-free MEM and blocked for 1 h with 1% BSA in PBS at room temperature. The cells were treated with 2 mM EGTA at 37 °C, as described above, and then gently washed with blocking medium. Clarified-viral cell lysates were added and allowed to adsorb at 4 °C for 30 min to the cells; the virus was removed and the monolayers were washed three times with cold serum-free MEM and resuspended in lysis buffer (50 mM Tris–HCl pH 7.5, 150 mM NaCl; 0.1% Triton X-100). The cells were frozen and thawed twice, and the amount of virus present in the cell lysates was determined by an enzyme-linked immunosorbent assay as previously described (Zárate et al., 2000a).

2.7. siRNA silencing of integrin expression

Specific small-interfering RNAs (siRNAs) sequences were selected against integrin subunits α2 or β3. The siRNA to α2 had the sequence AACUGGUACUGGUUGGUUCA (sense), corresponding to nucleotide positions 151–171 of the canine α2 integrin subunit

gene (accession number: XM.546326.2). The siRNA to β3 had the sequence AAGGAAAUCUGCUGAAGGAUA (sense), corresponding to nucleotide positions 187–207 of the canine β3 integrin subunit gene (accession number: NM.001003162.1). As an irrelevant control, a previously reported siRNA to the luciferase gene (López et al., 2004) was used. The siRNAs were obtained from Dharmacon Research (Lafayette, CO). Transfection of siRNAs was carried out in nearly confluent MDCKII cell monolayers using lipofectamine (Invitrogen) as previously described (López et al., 2004). Briefly, the transfection mixture was added to cells previously washed with serum-free and antibiotic-free MEM and incubated for 14–16 h at 37 °C. After this time the transfection mixture was removed, and the cells were washed and kept in this medium for 48 h at 37 °C before virus infection.

3. Results

3.1. Extracellular calcium depletion increases rotavirus infection of polarized MDCK cell

To test the role of basolateral molecules in rotavirus infection of polarized epithelia, we used as a model MDCK cell monolayers. Neuraminidase-sensitive (RRV and TFR-41) and -resistant (UK and Wa) viruses (as defined in MA104 cells) that differ in their reported use of integrins were used in this work. RRV and Wa are known to use integrins, while TFR-41 and UK have been reported not to use these molecules to infect MA104 cells (Graham et al., 2003).

Calcium is required to maintain the apical junction complex in place (Cerejido et al., 2004). Thus, the infectivity of rotaviruses in these cells was tested after the cell monolayers had been subjected to a brief treatment with EGTA, with the rationale that if basolateral molecules are needed for infection, calcium chelation would open the tight junctions (TJs), thereby exposing basolateral molecules to the virus, with a consequent increase in virus infectivity, as has been observed for other viruses (Coyné and Bergelson, 2006; Esclatine et al., 2000; Snooks et al., 2008; Topp et al., 1997; Walters et al., 2002). A brief treatment with 2 mM EGTA (see Section 2.5) was found indeed to increase rotavirus infectivity, as evidenced by detection of infectious foci by indirect immunofluorescence (shown for RRV and UK in Fig. 1A). The increase was higher for NA-resistant as compared to NA-sensitive strains (Fig. 1B), ranging from 1.5- to 2.5-fold in the case of the NA-sensitive strains to 8–28-fold for the NA-resistant viruses. A correlation between the enhancement of infectivity and the requirement for integrins was not observed. Viral particles stripped from their surface proteins by treatment with EDTA were not infectious in EGTA-treated cells, indicating that the outer protein layer is required for the observed enhancement of infectivity, and that the plasma membrane was not damaged by calcium chelation (not shown). However, it is not possible to completely rule out that other events, different than the receptor accessibility, could give rise to the increased infectivity observed.

The increase of rotavirus infectivity induced by calcium depletion was reversible. The virus infectivity decreased already by 15 min after calcium restoration to the cell culture medium, and it returned to basal levels at about 60 min after calcium addition (Fig. 2A). Calcium chelation with EGTA disturbed the TJs of the MDCK monolayers, as judged by the pattern of staining of the TJ proteins ZO-1 and occludin (Fig. 2B), while calcium restoration caused the relocation of these proteins to their original distribution, as previously reported (Ivanov et al., 2005). The degree of TJ relocation correlated with the decrease of rotavirus infectivity described in Fig. 2A. Altogether, these findings suggest that the increase of infectivity induced by calcium chelation is most probably due to opening of the TJs, with a consequent increased access of the virus

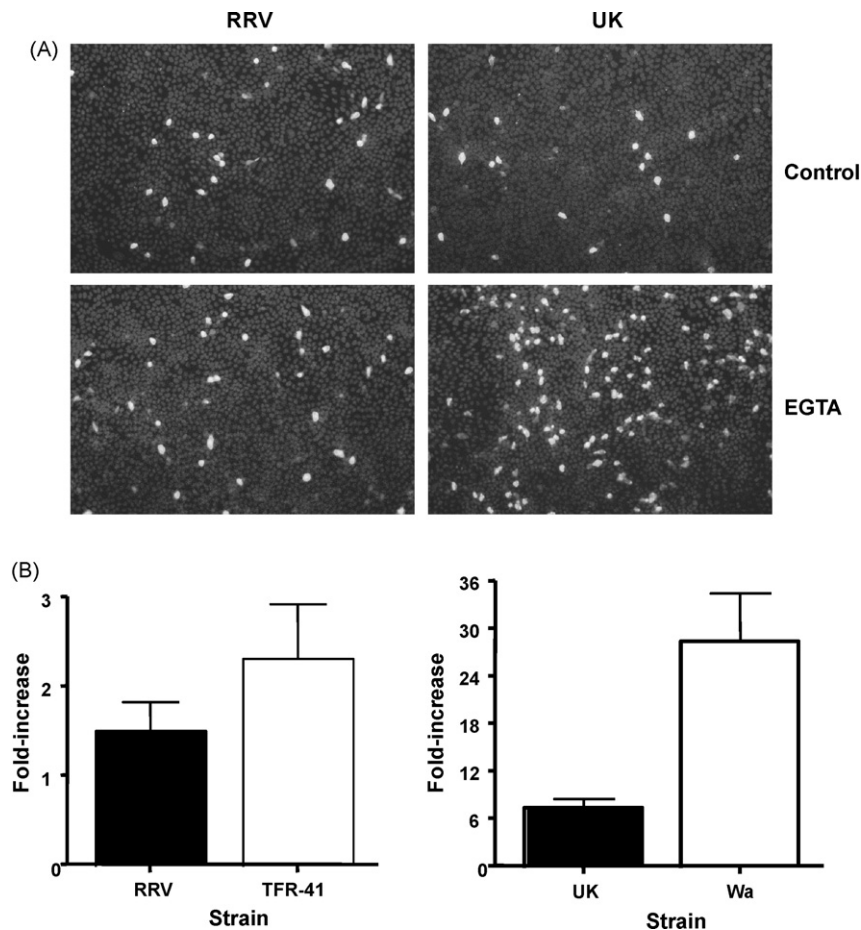


Fig. 1. A transient calcium depletion increases rotavirus infectivity. Tightly confluent monolayers of MDCKII cells grown in coverslips were incubated with 2 mM EGTA for 5 min and then infected with the indicated strains of rotavirus; 8 h post-infection the cells were fixed and processed for immunofluorescence as indicated under Section 2 (A) Immunofluorescence staining of cells treated or not with EGTA using a polyclonal antibody against rotavirus. (B) Number of EGTA-treated or untreated cells infected with the indicated rotavirus strains. Data are expressed as fold-increase of the virus infectivity observed in EGTA-treated as compared to control, untreated cells. The arithmetic mean \pm standard error of the mean of three independent experiments performed in duplicate is shown.

to basolateral receptors, originally located below TJs in polarized cells.

3.2. Rotaviruses preferentially infect the borders of polarized cell monolayers

MDCKII cells have been shown to form microcolonies or islets of polarized cells (Nusrat et al., 2000; Stutzmann et al., 2000; Walters et al., 2002). Given the increase of infectivity observed in cell monolayers when loosening the TJs by calcium chelation, a preferential infection of the cells located at the borders of microcolonies should be expected if rotaviruses require basolateral molecules for efficient cell infection. This, since the cells at the borders of the islets are not surrounded by cell neighbors, preventing them to form TJs and to polarize the plasma membrane molecules. To test this hypothesis, subconfluent monolayers of MDCKII cells were infected with the various rotavirus strains, and 8 hpi the infected cells were detected by indirect immunofluorescence. As expected, a marked preferential pattern of infection of the cells located at the border of the islets was observed under these conditions (Fig. 3A).

To rule out that the observed preferential border pattern of infection was due to the active spreading behavior of subconfluent MDCKII cells, and to test if in a fully polarized cell monolayer the cells located at the borders were more susceptible to rotavirus infection, a confluent monolayer of MDCKII cells was scratched with

a pipette tip 2 days after confluence, and infected with rotavirus. A clear preferential border pattern of infection was obtained with the NA-resistant strains UK and Wa, while this pattern was more difficult to detect for rotaviruses TFR-41 and RRV (shown for Wa in Fig. 3B).

3.3. Rotaviruses infect preferentially the basolateral side of polarized MDCKII cells grown on permeable supports

A facilitated infection by either the apical or basolateral domains of polarized cells could reflect a polarized distribution of the viral receptors. This can be directly tested by infecting cell monolayers grown on permeable membranes, which allow a basolateral access to the cells, only limited by the rate of virus transfer through the permeable support (Topp et al., 1997).

Previous works have explored the polarity of infection of rotaviruses using filters of either 0.4 or 3.0 μm pore size (Ciarlet et al., 2001; Svensson et al., 1991). In this work we initially tested the transfer of viral particles from either the apical or basolateral compartments to the opposite compartment in transwells in the absence of cells. We found that the transfer of viruses through 0.4 μm pores was negligible during the time used for virus adsorption (less than 0.1% of the input virus during 1 h at 37 °C), while about 15% of the virus diffused to the opposite compartment when 3.0 μm pore-diameter filters were used. As an additional control, just-confluent MA104 cells grown in 3.0 μm filters were infected

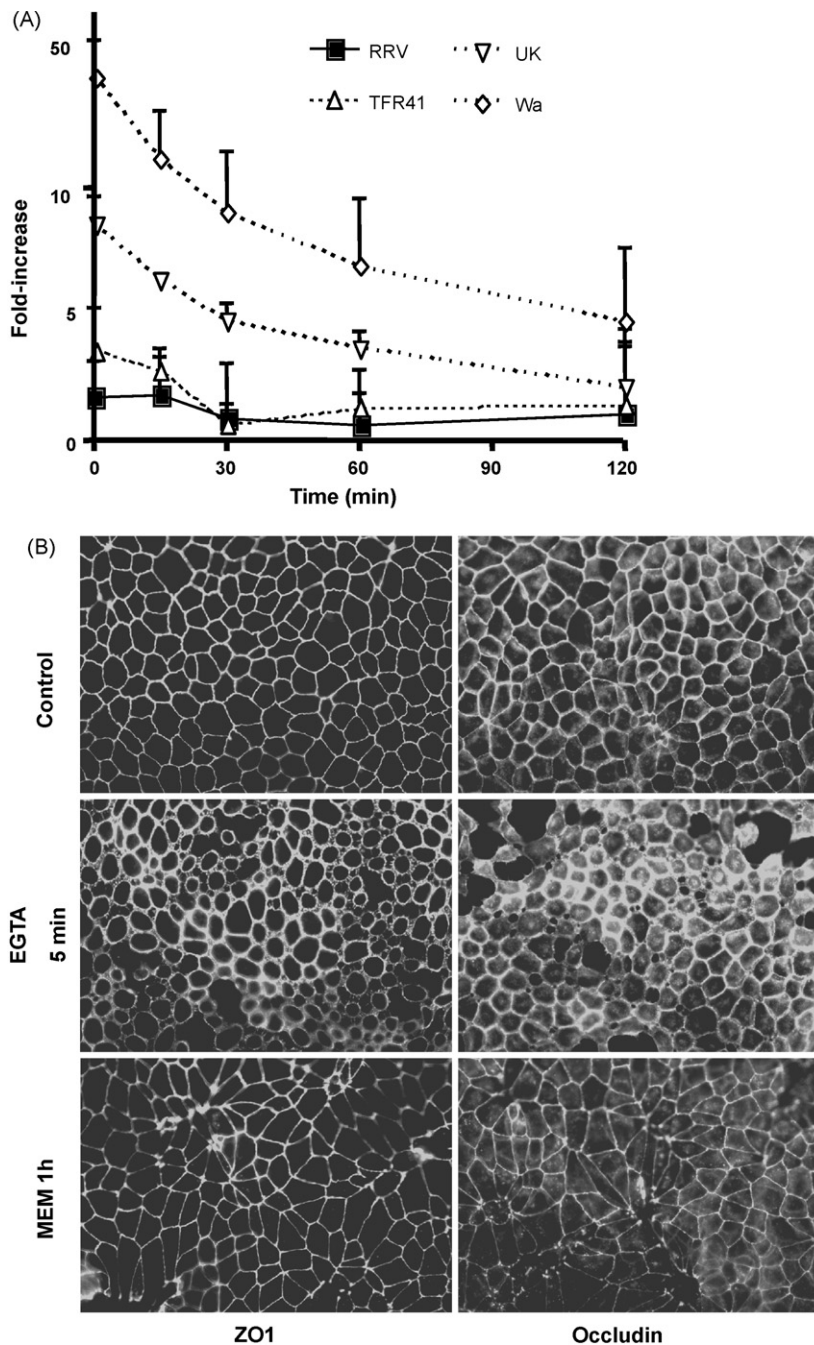


Fig. 2. The increase in rotavirus infectivity induced by EGTA is reversible. (A) MDCKII cells were incubated with 2 mM EGTA for 5 min, and then medium with normal calcium added for the indicated times. The cells were then infected with the different virus strains, the virus inoculum was removed and the infection was left to proceed for 15 h at 37 °C. The infected cells were fixed and immunostained as indicated under Section 2. Data are expressed as fold-increase of the virus infectivity observed in control, untreated cells. The arithmetic mean \pm standard deviation of three independent experiments performed in duplicate is shown. (B) MDCKII cells were incubated or not (Control) with 2 mM EGTA for 5 min, and then medium with normal calcium was replaced for 1 h (MEM 1 h). The cells were fixed and processed for immunofluorescence using antibodies to ZO-1 and occludin, as indicated.

from the upper and lower chambers of the transwells. Since these cells are not polarized under the conditions used, a lower infectivity when the virus is placed in the lower chamber should be the consequence of the limited transfer of the viral particles through the filter pores. After incubation with RRV for 1 h at 37 °C the infected cells were further incubated at 37 °C for 14 h, and the filters were stained by the peroxidase focus-forming assay described in Section 2.3. When the virus inoculum was placed in the lower chamber, the number of infected MA104 cells was about 30% that achieved when the virus was placed in the upper chamber (75 ± 10.4 vs.

210 ± 56.3). These findings are in agreement with the limited transfer of viral particles observed in the absence of cells, as described above.

One of the reasons researchers have used 0.4 μm -pore filters to evaluate the route of entry of viruses into polarized cells is that it has been reported that in 3.0 μm pores the cells can migrate through the pores of the filter, forming polarized monolayers on the opposite side (Ciarlet et al., 2001; Tucker et al., 1992), thus complicating the interpretation of the results. To evaluate the migration of MDCKII cells through 3.0 μm pores under our experimental condi-

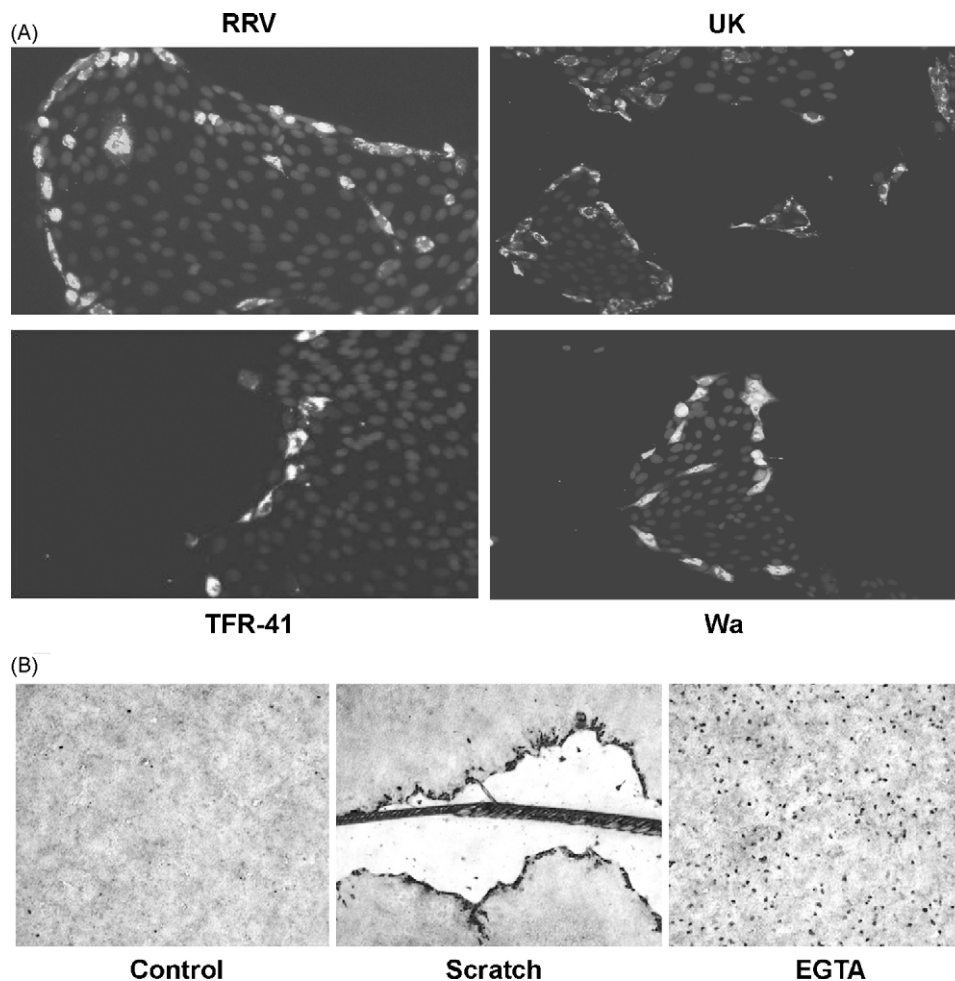


Fig. 3. Rotavirus preferentially infects cells with exposed basolateral surfaces. (A) Non-confluent MDCKII cells were infected with the indicated rotavirus strains. Eight hours post-infection the cells were fixed and immunostained with a polyclonal anti-rotavirus antibody. Nuclei were stained with DAPI. (B) Tightly confluent monolayers were scratched with a pipette tip before virus adsorption, or incubated with 2 mM EGTA for 5 min, and then the cells were infected with rotavirus Wa. At 12 h post-infection the cells were fixed and immunostained as indicated under Section 2. Panel A, 20 \times magnification; panel B, 10 \times magnification.

tions, the cells were grown on filters and allowed to polarize (TEER readings above 200 Ω cm²). The cells were then fixed and analyzed by confocal microscopy after staining with LamA/C antibodies to detect the nuclei and antibodies to the polarization marker protein ZO-1 to identify TJs. Fig. 4A shows that the cell monolayer was polarized, as judged by the honeycomb pattern obtained with the mAb to ZO-1. From analysis of the spatial distribution of nuclei in Fig. 4B and C (XZ and YZ projections of Fig. 4A) it can be appreciated that the cell monolayer only grew on one side of the filter, with single cells being eventually present on the opposite side (Fig. 4B and C).

Given the previous results, the polarity of rotavirus infection of MDCKII cell monolayers was evaluated using 3.0 μ m pore-diameter filters. Under the conditions employed, a single cell monolayer with the expected TEER value of 500–600 Ω cm² formed after 4–5 days of culture. In these assays we found that all rotavirus strains tested had a tendency to infect preferentially the basolateral side, as compared to the apical side of the cell monolayer. The basolateral preference for infection was more pronounced for the NA-resistant rotavirus strain Wa (Fig. 5A). However, if it is considered that only about one third to one sixth of the virus effectively reaches the cell monolayer when adsorbed basolaterally (i.e., through the filter) as compared to the virus adsorbed apically, infection by the basolateral surface of the cells would be clearly favored by all rotavirus strains (between 5 and 11 times if we assume 25% of the virus can reach the cells by

the basolateral side under the conditions used; see Fig. 5B). Altogether, these results indicate that rotaviruses can use either apical or basolateral receptors to infect MDCKII cells.

3.4. RRV infects the apical and basolateral surfaces of polarized MDCKII cells by attaching to terminal sialic acids

The infectivity of RRV and TFR-41 is known to depend on the presence of TSAs on the cell surface. The interaction of these viruses with TSA has been characterized predominantly in MA104 cells. Thus, it was of interest to test if the infection of polarized MDCKII cells by RRV also depends on the interaction with TSA. As control we used a well-characterized NA-resistant, SA-independent mutant of RRV, named nar3 (Méndez et al., 1993). The infectivity of RRV decreased by about 61% when added apically to filter-grown polarized MDCKII cell monolayers that had been previously treated with 80 mU/ml of neuraminidase from *A. ureafasciens* (Fig. 6A). Surprisingly, since TSA are mostly located on the apical surface of polarized cells (Ulloa and Real, 2001), NA-treatment of the basolateral membrane surface also reduced the infection of RRV to a similar extent (56%) (Fig. 6A). On the other hand, the infectivity of nar3 remained unaffected when the virus was added either by the apical or basolateral surfaces, as expected. Filter-grown MDCKII cells were also infected from the apical or basolateral compartment with RRV or nar3 viruses that had been previously incubated with 100 μ g/ml of

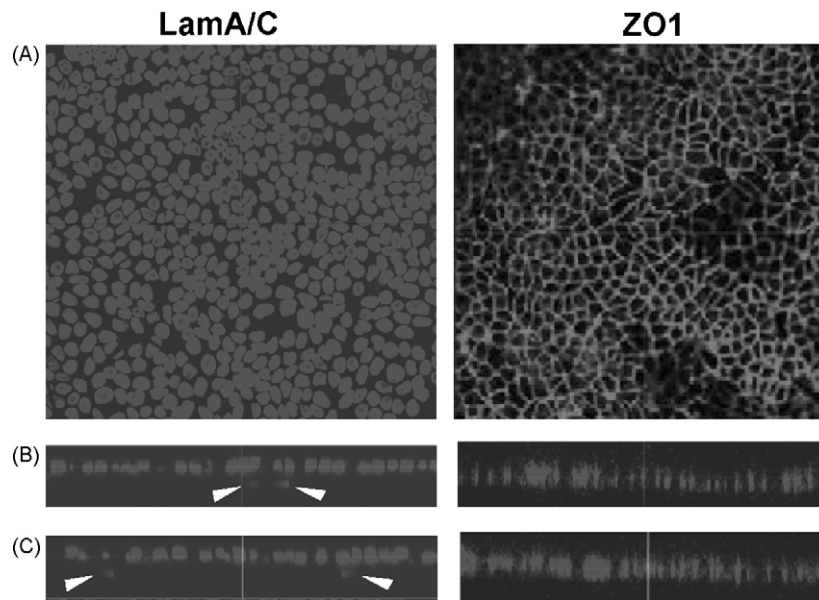


Fig. 4. MDCKII cells grown in permeable supports with a 3.0 μm pore size form a uniform cell monolayer on the filter membrane. Confluent MDCKII cells grown in 3.0 μm filters in transwells were fixed and processed for immunofluorescence using antibodies to either lamin (Lam A/C) or ZO-1, as indicated. Filters were excised from the holder and analyzed by confocal microscopy to assess monolayer homogeneity. Exhaustive multidimensional examination for cells growing on the downside of the filter membrane did not show any alternate monolayer as a result of cell migration through the filter membrane. (A) A representative section was imaged and transverse sections (XZ section in (B), and YZ section in (C)) were obtained from the image sets to confirm the lack of additional growth underneath the filter membrane. Arrows in B and C show single cells eventually present underneath the filter.

gphA. Treatment with this sialoglycoprotein affected only the infectivity of RRV; the decrease in infectivity of this virus was similar regardless whether it was added apically or basolaterally (Fig. 6B). These results indicate that RRV depends on the presence of TSA to infect both the apical and basolateral membrane domains of polarized MDCKII cells. Moreover, treatment of rotaviruses RRV

and TFR-41 with gphA blocked virus infectivity in cells treated with EGTA, indicating that infection of EGTA-treated MDCKII cell monolayers also depends on the presence of TSA and on a functional VP8* (data not shown).

3.5. Cellular binding is increased after EGTA treatment of polarized MDCKII cells

The observations that disruption of TJs by calcium chelation increases virus infectivity, and the virus infects cells preferentially via the basolateral plasma membrane, are consistent with the idea that rotavirus requires basolateral molecules for efficient infection of polarized MDCKII cells. To investigate if the enhancement of infectivity induced by EGTA was due to a facilitated attachment of the virus to the cell surface, we determined the binding of the virus to monolayers of polarized MDCKII cells previously treated or not with EGTA. The NA-sensitive viruses RRV and TFR-41 did not show an increased binding in EGTA-treated, as compared to untreated cells. On the other hand, the binding of the NA-resistant viruses UK and Wa augmented after 5, 10, and 20 min of incubation at 4 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 7). The largest increase, of about 3.5-fold, was observed for rotavirus Wa. Thus, a correlation exists between the increase of cell binding induced by EGTA and the enhancement of infectivity observed in cells treated with this chelating agent. This fact suggests that at least a fraction of the increase in infectivity observed under these conditions seems to be the result of an enhanced attachment of the virus particles to the cell surface, most probably due to an increased availability of attachment receptors that might result from the diffusion of basolateral molecules to the apical plasma membrane.

3.6. Integrins are required for rotavirus infection of MDCKII cells

$\alpha\beta 1$ and $\alpha\beta 3$ integrins, molecules with a predominant basolateral distribution in polarized epithelia, have been implicated as cellular receptors for rotavirus entry. To evaluate their role in rotavirus infection of polarized MDCKII cells, the expression of $\alpha 2$ and $\beta 3$ integrin subunits was silenced by RNA interference. The

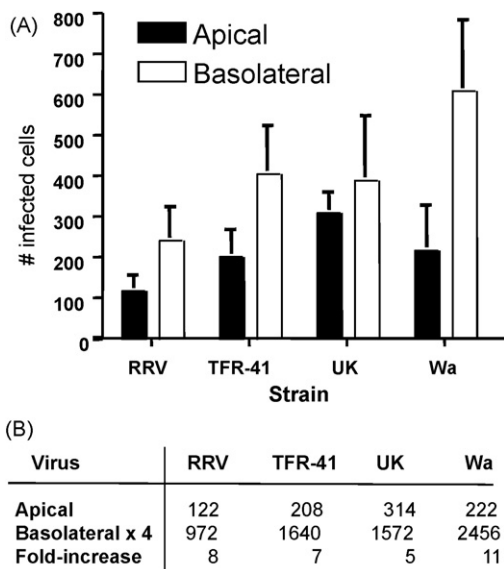


Fig. 5. Different rotavirus strains exhibit preferential infection through the basolateral side of MDCKII cells. Filter-grown cell monolayers were infected either apically or basolaterally with the indicated rotavirus strains. (A) Twelve hours post-infection cells were fixed and immunostained as indicated under Section 2. Data are expressed as the number of infected cells scored in a vertical section corresponding to one third the complete area of the filter. The arithmetic mean \pm standard error of the mean of four independent experiments performed in duplicate is shown. (B) Differences in the number of infected cells were corrected according to the calculated transfer of the virus through the filter membrane of about 25% during the 1 h adsorption period; based on these corrected numbers, the basolateral/apical fold-increase in infectivity was calculated.

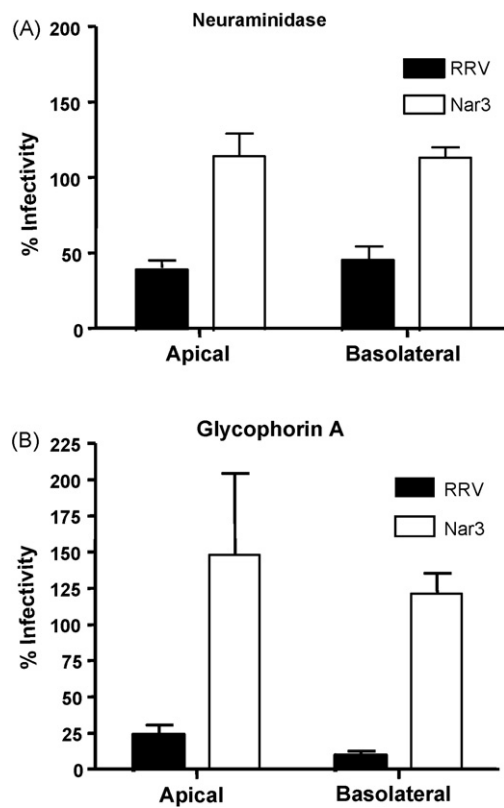


Fig. 6. The infectivity of RRV depends on the presence of TSA. (A) Confluent MDCKII cells grown in transwells were treated or not with 80 mU of *A. ureafasciens* neuraminidase either apically or basolaterally for 1 h at 37 °C, and then were infected with RRV or nar3 viruses. (B) RRV and nar3 lysates were pre-incubated with 100 µg of glycophorin A for 1 h at 37 °C, and then were used to infect MDCKII either apically or basolaterally. In (A) and (B) the infection was left to proceed for 14 h at 37 °C, and the infected cells were fixed and immunostained as indicated under Section 2. Data are expressed as a percentage of the virus infectivity observed in control untreated cells (100%) (A) or with untreated nar3 or RRV lysates (B). The arithmetic mean ± standard error of the mean of three independent experiments performed in duplicate is shown.

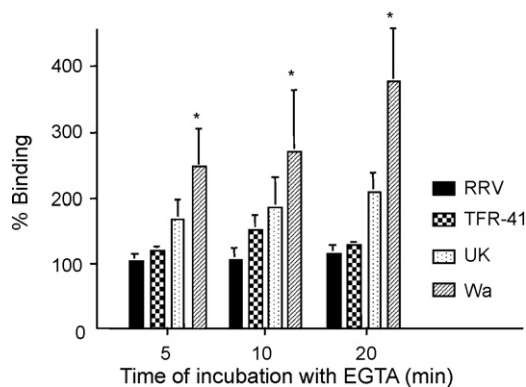


Fig. 7. EGTA induces an increase in rotavirus binding. Monolayers of MDCKII cells grown in 48-well plates were pre-incubated with 2 mM EGTA for the indicated times, and then incubated with the different viruses for 1 h at 4 °C. The excess unbound virus was removed, and the virus attached to the cells was determined by an ELISA as indicated under Section 2. Data are expressed as the percentage of virus bound to the cells when the cells were pre-incubated with PBS as a control. The arithmetic mean ± standard error of the mean of three independent experiments performed in duplicate are shown. Statistical significance is denoted by an asterisk, $p < 0.05$.

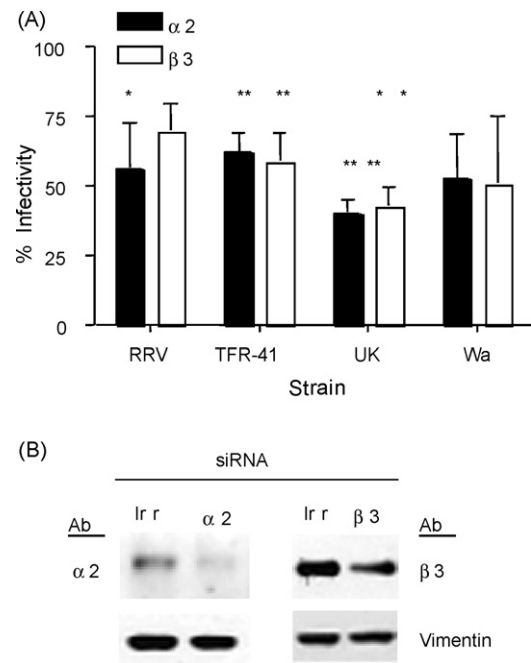


Fig. 8. Rotavirus infectivity depends on the presence of α2 and β3 integrin subunits in MDCKII cells. MDCKII cells grown in coverslips were transfected with the indicated siRNAs and 72 h post-transfection were infected with the different rotavirus strains. 12–14 hpi the cells were fixed and immunostained as indicated under Section 2. (A) The number of infected cells was scored and the infectivities are expressed as percentages of the infected cells found in control (irrelevant siRNA-transfected cells) that represent the 100%. One asterisk, $p < 0.05$; two asterisks, $p < 0.01$, according to a non-parametric Mann–Whitney *U*-test. (B) Immunoblot analysis of cell lysates from cells transfected with the indicated siRNAs. The antibodies used to integrin subunits α2 or β3, or to vimentin, used as a loading control, are indicated.

expression of these molecules was knocked-down by about 70%, as evaluated by Western blot (Fig. 8B). Rotavirus infectivity was determined in polarized cell monolayers grown in glass coverslips that had been previously transfected with the siRNAs to the integrins subunits or with an irrelevant siRNA as control. Since integrins have a basolateral distribution, we reasoned that the effect of knocking-down their expression would be more evident if TJJs were disrupted before infection. Thus, the siRNA-transfected cell monolayers were treated with 2 mM EGTA for 5 min, as described in Section 2.5, and subsequently infected with rotavirus. The infectivity of both the integrin-dependent (RRV and Wa) as well as the integrin-independent (TFR-41 and UK) viruses was decreased between 30 and 60% (Fig. 8B). These results suggest that integrins are involved in rotavirus infection of MDCK cells, and that UK and TFR-41 virus strains that have been suggested not to use integrins to infect MA104 cells, do utilize these molecules to enter into MDCKII cells.

4. Discussion

Several molecules have been involved as cellular receptors for rotavirus. These include gangliosides and integrins, which in polarized epithelia have a predominant apical and basolateral distribution, respectively (for a review see López and Arias, 2004). In this work we evaluated the ability of rotavirus strains with different receptor requirements to infect the apical and basolateral surfaces of polarized MDCKII cell monolayers. We found that all tested strains infected efficiently both membrane surface domains. The ability to infect cells apically seems natural for viruses that reach the intestinal epithelium from the apical surface. However, of interest, our findings suggest that basolateral molecules are important, and may be sufficient, for rotavirus to efficiently infect

polarized cells, since: (i) disruption of TJs of polarized MDCKII cell monolayers by calcium chelation leads to an increment of rotavirus infectivity that is reversible upon restoration of the divalent cation, (ii) the virus infects preferentially the cells located at the borders of microcolonies of polarized cells, and (iii) in cells grown on a permeable support the virus can start the infection by either cell side, although it preferentially infects (5–11-fold more efficiently) via the basolateral domain.

Although the behavior of the rotavirus strains characterized in this work was qualitatively similar, it was quantitatively different. The access to basolateral cell molecules seems to favor particularly the efficiency of infection of the NA-resistant rotavirus strains Wa and UK, since: (i) the increase of infectivity in MDCKII cell monolayers treated with EGTA was larger for NA-resistant as compared to NA-sensitive strains, (ii) the striking pattern of infection of the cells located at the borders of microcolonies was easier to find for NA-resistant viruses, (iii) the infection of the cells at the borders of cell monolayers that had been scratched with a pipette tip was mostly observed for these viruses, and (iv) the largest increase of binding in polarized cell cultures treated with EGTA and the largest ratio of basolateral/apical infection of MDCKII cells grown in permeable filters was observed for rotavirus Wa.

The differences between NA-resistant and -sensitive strains probably result from their different usage of cellular receptors. While the NA-sensitive strains attach to SA on the apical cell surface (see Fig. 6A for RRV), which is abundant in this cell surface domain, the cell molecule used by NA-resistant strains to attach to cells is less well characterized. In the case of the NA-resistant variant of RRV, nar3, integrin $\alpha 2\beta 1$ was shown to function as a binding receptor in MA104 cells (Zárate et al., 2000a,b). In addition, the internal SA in gangliosides, like that present in GM1 has been suggested to function as binding receptors for NA-resistant rotavirus strains KUN, MO, and UK (Delorme et al., 2001; Guo et al., 1999; Isa et al., 2006). Delorme et al. (2001) analyzed the binding properties of NA-sensitive (strains SA11 and NCDV) and -resistant (strain UK) rotaviruses with a large panel of glycosphingolipids, leading them to conclude that neuraminidase-sensitive strains bind to external (or terminal) sialic acid residues in gangliosides, while neuraminidase-insensitive strains recognize gangliosides with internal SAs. More recently, Haselhorst et al. (2009) used NMR spectroscopy, molecular modeling and infectivity competition assays to show that *N*-acetylneuraminic acid is a key determinant for binding of both NA-sensitive (strain CRW-8) and -resistant (strain Wa) rotaviruses. They also showed that the ganglioside GM1 subterminal SA moiety is part of the binding epitope used for recognition by Wa VP8*, confirming previous suggestions (Delorme et al., 2001), and supporting the notion that the Wa virus is not SA-independent. If most or all of the so far described NA-resistant rotavirus strains indeed use subterminal SA as attachment receptors remains to be determined.

The infection of the NA-sensitive virus RRV by the basolateral surface was also mediated by interactions of the virus with TSA, since its infectivity was decreased by NA treatment of the cells and by pre-incubation of the virus with gphA (see Fig. 6B). Although gangliosides have a predominant apical distribution in polarized cells, this segregation is not absolute and gangliosides have been reported to be also present in the basolateral surface of Caco-2 and MDCKII cells (Ulloa and Real, 2001), although in lower amounts than in the apical domain. NA-resistant rotaviruses might also bind to subterminal SAs on basolateral gangliosides or on integrin or other uncharacterized protein receptors.

Rotavirus cell entry in nonpolarized MA104 cells has been proposed to be a multistep process in which the virus first binds to an attachment receptor on the cell surface, and subsequently interacts with post-attachment receptors that mediate the entry of the virus into the cellular cytoplasm via the classical clathrin-mediated

endocytosis or by a different ill-characterized endocytosis mechanism, depending on the rotavirus strain (Sánchez-San Martín et al., 2004; Gutiérrez et al., submitted).

The observation that rotavirus can efficiently initiate infection of polarized cells via either plasma membrane domain might be explained if all the required cell molecules for virus entry were present in both cell surface domains, although in different concentrations in each domain. Alternatively, the virus might be able to attach to either side, disturb the TJs, and then use post-attachment receptors that might have been originally hidden in the opposite membrane domain, under the TJs. A subgroup of coxsackievirus B have been described to gain access into the cells by the latter mechanism; these viruses first bind to a GPI-anchored decay accelerating factor receptor on the apical side of cells, activating cellular signals that open the TJ barrier, allowing the viruses to interact with the primary basolateral receptor CAR that activates virus internalization by a caveolin-dependent pathway (Coyne and Bergelson, 2006). We hypothesize that either of the two mechanisms mentioned above may actually operate during rotavirus infection. It has been recently reported that when the recombinant RRV VP8* domain of VP4 is added to the apical surface it is able to disrupt the TJs of polarized MDCKII cells, increasing the paracellular permeability of the cell monolayer in a reversible manner (Nava et al., 2004). The treatment of the polarized monolayer with VP8* was shown, among other things, to trigger the movement of basolateral $\alpha V\beta 3$ integrin and $\beta 1$ integrin subunit to the apical surface. These results suggest that the binding of rotavirus VP8 to receptors in the apical membrane domain could disturb the TJ and promote the movement of basolateral receptors to the apical cell surface, facilitating virus cell infection. On the other hand, the observation that all rotaviruses were able to infect cells preferentially via their basolateral surface indicates that they are able to attach to this surface, where attachment and post-attachment receptors appear to be present, making the cell entry process more efficient.

It has been reported that some rotavirus strains do not require integrins to infect MA104 cells (Graham et al., 2003). Of interest, the infectivity of all four virus strains characterized in this work was affected by silencing the expression of integrin subunits $\alpha 2$ and $\beta 3$, strongly suggesting that these cellular molecules are involved in the entry of these viruses into MDCKII cells. It is well known that viruses can use different cell receptors and even different entry pathways in different cell lines (Bielefeldt-Ohmann et al., 2001; Bomsel and Alfsen, 2003; Damm et al., 2005; Pelkmans et al., 2001). Thus, it is important to consider that integrins, which are not required by some rotavirus strains to infect MA104 cells (Graham et al., 2003; Isa et al., 2009), could be needed to infect other cell types, like MDCKII cells as shown in this work.

The question of whether rotavirus infects polarized epithelial cells in a vectorial manner has been addressed before, with conflicting results. Svensson et al. (1991) found that rotavirus RRV infects polarized Caco-2 and MDCKI cells in a symmetrical manner. On the other hand Ciarlet et al. (2001) reported that while NA-resistant viruses efficiently infected both sides of the epithelium of a panel of polarized cell lines that included Caco-2, MDCKI, and MDCKII cells, RRV and other NA-sensitive viruses only infected efficiently through the apical surface of cells. The differences observed could be explained, at least in part, by the pore size of the filters used and the fact that the barrier the filters represent was not taken into account in the previous works. Ciarlet et al. (2001) used filters with a 0.4 μm pore size, which have been reported to be highly restrictive for the transfer of viruses. In our work we observed that less than 0.1% of the input virus diffused to the opposite side of transwell membranes in the absence of cells when incubated for 1 h at 37 °C. In the case of hepatitis A virus, 5–6% of the original inoculum was found to diffuse from the basolateral to the apical chamber of transwell tissue culture inserts in the absence of cell

monolayers after 2 h of incubation (Blank et al., 2000), while 30% of the virus passed in the same direction in 3.0 μm pore-size filters (Snooks et al., 2008). In agreement with our results, only 0.9% of the applied herpes simplex virus passed to the apical chamber in 0.4 μm filters after 2 h (Topp et al., 1997). The data reported by Ciarlet et al. (2001) was only qualitative; however, analysis of the apparent number of infectious foci obtained when the cells were infected by either side with RRV allows to roughly calculate a ratio of apical/basolateral infection of about 10–100-fold, depending on the cell line tested (see Fig. 2 in Ciarlet et al., 2001). These results could be reconciled with ours if we consider the restriction of the virus to diffuse through 0.4 μm filters. If we take into account a permeation factor of about 100-fold in MDCKII in the work by Ciarlet et al. (2001), the infectivity of SA-independent strains would then be a lot larger by the basolateral surface while the infectivity of SA-dependent strains would be similar in the two cell surfaces.

On the other hand, Svensson et al. (1991) used 3.0 μm filters to evaluate the site of entry of RRV into polarized Caco-2 and MDCKI cells. Their results indicating that the virus infects Caco-2 cells in a nonpolar fashion are complicated by the observation that these cells have been reported to form at least a subconfluent polarized cell monolayer on the opposite side of the filter (Tucker et al., 1992). However, they showed an infection apical/basolateral ratio in MDCKI cells for Semiliki Forest virus of about 1:1000 (Svensson et al., 1991), indicating that the monolayer of MDCKI cells was well formed and kept the proper orientation, probably with low migration of the cells to the opposite side of the filter. In addition, Svensson et al. (1991) also found a 7-fold difference in the RRV titer when nonpolarized CV1 cells, which were used as control, were infected by the apical vs. the basolateral cell surfaces, indicating a similar transfer restriction as that found in our work.

The efficient infection through the basolateral membrane surface of polarized cells might be highly relevant for the pathogenesis of rotavirus, especially given the recent reports of antigenemia and extraintestinal spread in children and animal models (Azevedo et al., 2005; Blutt et al., 2003). Particularly relevant is the observation that a virulent variant of the human rotavirus strain Wa was able to infect the gastrointestinal tract of neonatal pigs via viruses present in the blood, also causing rotavirus shedding from the upper respiratory tract of neonatal animals (Azevedo et al., 2005). Whether the pathogenesis of rotavirus is related to the ability of the virus to spread extraintestinally and to its efficiency to infect the basolateral surface of polarized intestinal cells remains to be determined.

Acknowledgements

We are grateful to Pedro Romero for his excellent technical assistance with cell culture; and to Andrés Saralegui for his assistance with the confocal microscope. This work was supported by grant 55005515 from the Howard Hughes Medical Institute, IN210807 from DGAPA-UNAM, and 60025 from the National Council for Science and Technology-Mexico.

References

- Arias, C.F., Romero, P., Alvarez, V., Lopez, S., 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.* 70, 5832–5839.
- Azevedo, M.S., Yuan, L., Jeong, K.I., Gonzalez, A., Nguyen, T.V., Pouly, S., Gochbauer, M., Zhang, W., Azevedo, A., Saif, L.J., 2005. Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. *J. Virol.* 79, 5428–5436.
- Bielefeldt-Ohmann, M., Meyer, M., Fitzpatrick, D.R., Mackenzie, J.S., 2001. Dengue virus binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains. *Virus Res.* 73, 81–89.
- Blank, C., Anderson, D., Beard, M., Lemon, S.M., 2000. Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. *J. Virol.* 74, 6476–6484.
- Blutt, S.E., Kirkwood, C.D., Parreño, V., Warfield, K.L., Ciarlet, M., Estes, M.K., Bok, K., Bishop, R.F., Conner, M.E., 2003. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet* 362, 1445–1449.
- Bomsel, M., Alfsen, A., 2003. Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 57–68.
- Cerejido, M., Contreras, R.G., Soshani, L., 2004. Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiol. Rev.* 84, 1229–1262.
- Ciarlet, M., Estes, M.K., 2001. Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 435–441.
- Ciarlet, M., Crawford, S., Estes, M.K., 2001. Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. *J. Virol.* 71, 11834–11850.
- Coulson, B.S., Londrigan, S.L., Lee, D.J., 1997. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 5389–5394.
- Coyne, C.B., Bergelson, J.M., 2006. Virus-induced abl and fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124, 119–131.
- Crawford, S.E., Patel, D.G., Cheng, E., Berkova, Z., Hyser, J.M., Ciarlet, M., Finegold, M.J., Conner, M.E., Estes, M.K., 2006. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. *J. Virol.* 80, 4820–4832.
- Cuadras, M.A., Arias, C.F., López, S., 1997. Rotaviruses induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca^{2+} concentration to initiate their replication cycle. *J. Virol.* 71, 9065–9074.
- Damm, E.M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T., Helenius, A., 2005. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.* 168, 477–488.
- Delorme, C., Brussow, H., Sidoti, J., 2001. Glycosphingolipid binding specificities of rotavirus: identification of a sialic acid-binding epitope. *J. Virol.* 75, 2276–2287.
- Esclatine, A., Lemullois, M., Servin, A.L., Quero, A.M., Geniteau-Legendre, M., 2000. Human cytomegalovirus infects Caco-2 intestinal epithelial cells basolaterally regardless of the differentiation state. *J. Virol.* 74, 513–517.
- Espejo, R.T., López, S., Arias, C.F., 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37, 156–160.
- Estes, M.K., Graham, D.Y., Mason, B.B., 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* 39, 879–888.
- Graham, K.L., Halasz, P., Hewish, M.J., Takada, Y., Mackow, E.R., Robinson, M.K., Coulson, B.S., 2003. Integrin-using rotaviruses bind $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ integrin α2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize $\alpha\text{X}\beta\text{2}$ and $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ by using VP7 during cell entry. *J. Virol.* 77, 9969–9978.
- Guerrero, C.A., Méndez, E., Zárate, S., Isa, P., López, S., Arias, C.F., 2000a. Integrin $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ mediates rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 14644–14649.
- Guerrero, C.A., Zárate, S., Corkidi, G., López, S., Arias, C.F., 2000b. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* 74, 9362–9371.
- Guerrero, C.A., Bouyssouade, D., Zárate, S., Isa, P., López, T., Espinosa, R., Romero, P., Méndez, E., López, S., Arias, C.F., 2002. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J. Virol.* 76, 4096–4102.
- Guo, C., Nakagomi, O., Mochizuki, M., Ishida, H., Kiso, M., Ohta, Y., Suzuki, T., Miyamoto, D., Hidari, K.I., Suzuki, Y., 1999. Ganglioside GM1a on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. *J. Biochem.* 126, 683–688.
- Gutiérrez, M., Isa, P., Sánchez-San Martín, C., Pérez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C.F., López, S., 2009. Different rotavirus strains may enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.*, submitted.
- Haselhorst, T., Fleming, F.E., Dyason, J.C., Hartnell, R.D., Yu, X., Holloway, G., Sante-goets, K., Kiefel, M.J., Blanchard, H., Coulson, B.S., Von Itzstein, M., 2009. Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nat. Chem. Biol.* 5, 91–93.
- Isa, P., Arias, C.F., López, S., 2006. Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj. J.* 23, 27–37.
- Isa, P., Sánchez-Alemán, M.A., López, S., Arias, C.F., 2009. Dissecting the role of integrin α2 and β3 in rotavirus cell entry by RNA silencing. *Virus Res.* 145, 251–259.
- Ivanov, A.I., Nusrat, A., Parkos, C.A., 2005. Endocytosis of the apical junctional complex: mechanism and possible roles in regulation of epithelial barriers. *Bioessays* 27, 356–365.
- López, S., Arias, C.F., 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 12, 271–278.
- López, T., Camacho, M., Zayas, M., Nájera, R., Sánchez, R., Arias, C.F., López, S., 2004. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J. Virol.* 79, 184–192.
- Méndez, E., Arias, C.F., López, S., 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* 67, 5253–5259.
- Nava, P., López, S., Arias, C.F., Islas, S., González-Mariscal, L., 2004. The rotavirus surface protein VP8* modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *J. Cell Sci.* 117, 5509–5519.
- Nusrat, A., Parkos, C.A., Verkade, P., Foley, C.S., Liang, T.W., Innis-Whitehouse, W., Eastburn, K.K., 2000. Tight junctions are membrane microdomains. *J. Cell Sci.* 113, 1771–1781.
- Parashar, U.D., Gibson, C.J., Bresee, J.S., Glass, R.I., 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 304–306.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Helenius, A., 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* 3, 473–483.

- Rolsma, M.D., Kuhlenschmidt, T.B., Gelber, H.B., Kuhlenschmidt, M.S., 1998. Structure and function of a ganglioside receptor for porcine rotavirus. *J. Virol.* 72, 9079–9091.
- Sánchez-San Martín, C., López, T., Arias, C.F., López, S., 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* 78, 2310–2318.
- Schoenenberger, C.A., Zuk, A., Zinkl, G.M., Kendall, D., Matlin, K.S., 1994. Integrin expression and localization in normal MDCK cells and transformed MDCK cells lacking polarity. *J. Cell Sci.* 107, 527–541.
- Snooks, M.J., Bhat, P., Mackenzie, J., Counihan, N.A., Vaughan, N., Anderson, D.A., 2008. Vectorial entry and release of hepatitis A virus in polarized human hepatocytes. *J. Virol.* 82, 8733–8742.
- Stutzmann, J., Bellissent-Waydelich, A., Fontao, L., Launay, J.F., Simon-Assmann, P., 2000. Adhesion complexes implicated in intestinal epithelial cell–matrix interactions. *Microsc. Res. Technol.* 51, 179–190.
- Svensson, L., Finlay, B.B., Bass, D., Von Bonsdorff, C.H., Greenberg, H.B., 1991. Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J. Virol.* 65, 4190–4197.
- Topp, K.S., Rothman, A.L., Lavail, J.H., 1997. Herpes virus infection of RPE and MDCK cells: polarity of infection. *Exp. Eye Res.* 64, 343–354.
- Tucker, S.P., Melsen, L.R., Compans, R.W., 1992. Migration of polarized epithelial cells through permeable substrates of defined pore size. *Eur. J. Cell. Biol.* 58, 280–290.
- Ulloa, F., Real, F.X., 2001. Differential distribution of sialic acid in alpha2,3 and alpha 2,6 linkages in the apical membrane of cultured epithelial cells and tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 501–510.
- Vogelmann, R., Amieva, M.R., Falkow, S., Nelson, W.J., 2004. Breaking into the epithelial apical–junctional complex—news from pathogen hackers. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 16, 86–93.
- Walters, R.W., Freimuth, P., Moninger, T.O., Ganske, I., Zabner, J., Welsh, M.J., 2002. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 110, 789–799.
- Zárate, S., Espinosa, R., Romero, P., Guerrero, C.A., Arias, C.F., López, S., 2000a. Integrin $\alpha 2\beta 1$ mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology* 278, 50–54.
- Zárate, S., Espinosa, R., Romero, P., Méndez, E., Arias, C.F., López, S., 2000b. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotavirus to cells. *J. Virol.* 74, 593–599.
- Zárate, S., Cuadras, M.A., Espinosa, R., Romero, P., Juárez, K.O., Camacho-Núñez, M., Arias, C.F., López, S., 2003. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J. Virol.* 77, 7254–7260.

6 DISCUSION

Varias moléculas se han propuesto como receptores celulares para rotavirus, entre ellas gangliósidos e integrinas, las cuáles paradójicamente se distribuyen en forma distinta en los epitelios, estando las primeras mayoritariamente a nivel apical (superficie luminal) y las últimas a nivel basolateral (superficie serosal, o intersticial). Sin excepción, todas las cepas evaluadas en este trabajo mostraron infectividad en ambas superficies. Si se considera que las cepas probadas fueron seleccionadas de acuerdo a su requerimiento de unión inicial a sialósidos terminales y/o uso de integrinas como co-receptores, dos escenarios parecen posibles para explicar los resultados encontrados. El primero es que los criterios de clasificación usados para elegir las cepas probadas no refleje el comportamiento de estas cepas en el contexto de células polarizadas, y por extensión, con su eventual interacción con el epitelio blanco. La segunda opción es que exista un diferencial metodológico entre el acercamiento con cultivos de células *in vitro* ya sean estas polarizadas o no y el virus utilice diferentes estrategias en cada caso. En este caso el enfoque experimental seguido no permitiría diferenciar ambas estrategias.

Bajo la primera perspectiva, los resultados obtenidos que muestran diferencias cuantitativas en aumento de infectividad ante tratamiento con EGTA, en unión, y en infectividad basolateral comparada con la apical, sugieren que las cepas sí mantienen una cierta identidad y otorgan información comparativa valiosa de la interacción de los distintos virus con el epitelio. Es más, asumiendo que comparativamente entre el acercamiento metodológico de otros autores y el utilizado aquí, nuestro enfoque permitiese detectar diferencias menores en magnitud, se podría observar que todas las cepas exhiben preferencia por infectar desde la membrana basolateral y esto dejaría pendiente por establecer el mecanismo mediante el cual logran tener acceso a esta región del epitelio, que normalmente no es accesible desde la superficie luminal. El uso de sialósidos terminales merece atención especial, particularmente por la gran diferencia en su abundancia entre las superficies apical y basolateral.

Considerando la segunda perspectiva, los resultados de requerimiento de integrinas por parte de las cuatro cepas y la correlación cualitativa entre su infectividad polarizada y la

sensibilidad a tratamiento con NA sugieren que los virus altamente sensibles a tratamiento con NA como lo es la cepa RRV, podrían estar usando estrategias de entrada distintas en cultivos de MDCKII polarizadas y en células MA104, donde regularmente son propagados. En particular en su dependencia de integrinas. Reportes recientes del no uso de integrinas por parte de esta cepa en MA104 requieren una evaluación a la par con células MDCKII polarizadas para concluir si es una característica diferencial entre líneas o un artefacto metodológico (Isa *et al.*, 2009). Conviene destacar que la adaptación a cultivo de células y propagación *in vitro* podrían generar cambios fenotípicos en las diferentes cepas que disten de su comportamiento fisiológico en el hospedero natural.

Teniendo en cuenta la capacidad reportada para ciertas cepas de rotavirus de alcanzar tejidos extra-intestinales e infectar vía intersticial (Azevedo *et al.*, 2005), el conocimiento de la polaridad de infección de distintas cepas puede arrojar elementos sobre el tropismo de este virus *in vivo* y sus mecanismos de patogénesis. El uso de sistemas *in vitro* para evaluar la interacción con células epiteliales polarizadas puede ser muy informativo en este contexto. Sin embargo, debe tenerse presente, la alta capacidad adaptativa de los virus y las limitaciones metodológicas cuando se extrapola la información obtenida (Schneider-Schaulies, 2000).

De los resultados encontrados en este trabajo se deduce que el uso de AS por parte de la cepa RRV no discrimina entre la superficie por la cual se adsorba el virus. En relación con el uso de integrinas alfa2 y alfaVbeta3, todas las cepas fueron sensibles lo cual concuerda con lo esperado en cuanto a su importancia como receptores post-adhesión para muchos virus. Este requerimiento también fue descrito para rotavirus en células MA104 y se ha observado que es necesario pero no suficiente para explicar completamente la sensibilidad a la infección. Actualmente esta dependencia se encuentra bajo debate pues depende de la metodología con la cual se realice la evaluación (Isa *et al.*, 2008).

Todas las cepas analizadas mostraron preferencia por infectar desde la superficie basolateral. Los hallazgos específicos que sustentan esto son:

1. El relajamiento de las uniones estrechas por parte del tratamiento con EGTA quelando el calcio extracelular, el cual dio lugar a un aumento reversible de la

infectividad de las cuatro cepas. La reversibilidad del efecto es clave para descartar un efecto global pleiotrópico a todos los niveles de entrada del virus (unión inicial, penetración y decapsidación). La perturbación de las funciones de barrera en la monocapa fue transitoria.

2. Las cuatro cepas infectaron preferencialmente las células localizadas en los bordes de microcolonias de células polarizadas, donde las moléculas basolaterales son más accesibles. La región central de las microcolonias si exhibieron polarización, como se desprende de tinciones específicas de proteínas indicadoras, componentes de la unión intercelular apical (resultados no mostrados).
3. La infección en soportes permeables fue cuantitativamente semejante ya sea infectando las monocapas desde la superficie apical o basolateral, lo cual si se considera la limitación al flujo de los virus a través del soporte, implica que la superficie basolateral fue más susceptible a la infección, ya sea por que exhibe un número mayor de receptores comparado con la región apical, o por que estos se encuentran en una organización más compatible para interactuar con el virus como receptores celulares.
4. Las cuatro cepas exhibieron sensibilidad a la disminución en la expresión de las integrinas alfa2 y alfaVbeta3, las cuales se localizan preferencialmente en la superficie basolateral. En esta línea celular, el presente es el primer reporte de que estas dos integrinas son necesarias para una infección eficiente por parte de rotavirus.

La polaridad de infección por rotavirus ha sido evaluada en un par de ocasiones anteriormente. En la primera (Svensson *et al.*, 1991) se describió que la cepa RRV podía infectar células Caco-2 y MDCK en forma simétrica (con igual eficiencia por las superficies apical y basolateral), con lo cual se esperaba que el receptor para el virus debía ser una molécula no polarizada que se encontrase tanto apical como basolateralmente. En el segundo reporte (Ciarlet *et al.*, 2001b) se mencionó que el primer trabajo tenía dificultades técnicas pues las células podían migrar a través de soportes permeables de 3.0 μm de diámetro de poro (utilizados por Svensson y colaboradores, 1991) y formar otra monocapa

debajo del filtro, por lo que se estaba probando la polaridad de infección en forma errónea (el virus accedería a la superficie apical de ambas monocapas). Por ello, Ciarlet y colaboradores (2001b) usaron soportes permeables con un diámetro de poro de 0.4 μm donde sólo se forma la monocapa superior. En ese trabajo se analizaron varias cepas de rotavirus que representaban las dos categorías de sensibilidad a tratamiento con NA y se concluyó que la distribución de ácido siálico (apical) restringía la infectividad por parte de las cepas NA-sensibles (infección polarizada a la cara apical), mientras que las cepas que no requieren ácido siálico terminal infectaron igual desde ambas superficies celulares (Ciarlet *et al.*, 2001b).

Datos generados en nuestro trabajo y reportes de la literatura claramente muestran que la difusión del virus a través de los poros de los soportes permeables no es libre (Compans *et al.*, 1994; 1998). De hecho, es función del diámetro del poro del soporte y esto explica los resultados de polaridad de infección en el trabajo de Ciarlet y colaboradores (Ciarlet *et al.*, 2001b). Los virus incubados desde la superficie basolateral no alcanzan a difundir eficientemente a través de los poros del soporte. Un estimativo preliminar indica que tan solo 0.05 % de los virus inoculados en el compartimiento basolateral alcanza efectivamente la monocapa de células que crece sobre el soporte permeable de 0.4 μm de diámetro de poro, la preferencia por infección apical sería entonces solo aparente.

En el trabajo antes de Svensson y colaboradores (1991), y en el que aquí se presenta, se tuvo en cuenta la difusión limitada del virus a través de los soportes permeables usados para cultivar las células epiteliales. Tan solo una fracción del virus incubado alcanza a atravesar efectivamente el soporte permeable con poros de 3.0 μm de diámetro, y una fracción mucho menor (aproximadamente el 0.05 %) lo hace en el caso de los soportes de 0.4 μm de diámetro (datos no mostrados). Con estas dificultades técnicas en perspectiva decidimos iniciar el análisis de la polaridad de infección en condiciones de soportes impermeables y evaluando en primer lugar el uso o no de AS terminal por parte de cepas ampliamente caracterizadas como lo son RRV y nar3. Estas cepas son perfectamente diferenciables fenotípicamente en células MA104 pues la primera es dependiente de interacciones con AS terminal a través de su proteína viral VP8* (la hemaglutinina viral) y por ende sensible a su remoción de la superficie de las células mediada por NA, mientras la segunda no requiere

tal interacción pues se describió que se une directamente a la integrina alfa2beta1 a través de la proteína viral VP5* (Zárate *et al.*, 2000a, 2000b).

En células polarizadas el fenotipo diferenciable entre las cepas RRV y nar3 fue claramente observado. Ambas parecen comportarse como en células MA104 no polarizadas, en relación con su sensibilidad a la remoción de estos glicanos con neuraminidasa. Además, tal y como acontece en células MA104, el virus nar3 no es neutralizado por una sialoproteína usada para bloquear su interacción con ácido siálico, la glicoforina A (gphA), lo cual sugiere que la cepa RRV requiere de ácido siálico para la unión inicial y nar3 puede interactuar directamente con su receptor de unión en una forma independiente a su proteína VP8*.

Recientemente se publicaron estructuras de proteínas VP8* procedentes de cepas de rotavirus resistentes a tratamiento con NA, es decir que no requieren de interacción con sialósidos terminales que sean sensibles al corte con esta tipo de enzimas. En éstas se propuso que, además de desplegar determinantes de interacción con glicanos complejos, también exponen regiones que le permitirían interactuar con proteínas (Monnier *et al.*, 2006). Se piensa que el papel de la interacción con AS terminal es inducir en el virión un sutil cambio conformacional en el dominio VP5* para interacciones subsecuentes; en el caso de las cepas mencionadas antes, se requiere un modelo alternativo para ligar esta información con la interacción posterior con co-receptores de penetración. Estas interacciones posteriores se cree que se basan exclusivamente en la proteína VP5* y que existe una secuencia de eventos para que el virus pueda ingresar a su célula hospedera (Méndez *et al.*, 1999; López & Arias, 2004).

Se ha reportado que algunas subunidades de integrinas como beta1 son sializadas y podrían representar un importante componente del glicocálix celular (Praetorius *et al.*, 2001), su accesibilidad para patógenos luminales quedaría pendiente por ser evaluada. Por lo tanto, conviene mantener en mente que la interacción con sialósidos terminales como receptores de pegado inicial y el papel de moléculas co-receptoras de entrada o de penetración, bien podría estar íntimamente ligada y no fácilmente discernible desde el punto de vista experimental.

Recientemente se describió que la proteína VP8* de rotavirus RRV posee la capacidad para modular las funciones de cerca y compuerta del AJC (Nava *et al.*, 2004), sugiriendo la posibilidad de que su participación durante la entrada de rotavirus fuese relevante a células polarizadas. En la infección por rotavirus la perturbación de las funciones de transporte vectorial de solutos son características de la diarrea (Lorrot & Vasseur, 2007). Previamente se describieron en Caco-2 modificaciones en la distribución de las proteínas subyacentes al complejo submembranal del AJC como resultado a la infección por rotavirus, luego de 18 hpi (Dickman *et al.*, 2000), así como también cambios en la TEER a tiempos largos post infección (Obert *et al.*, 2000). En estos reportes no se evaluaron cambios en la TEER durante las primeras etapas de infección.

Existe un reporte en el que se describe que rotavirus interactúa directamente con las proteínas del AJC (Dickman *et al.*, 2000). Además, se sabe que en las células epiteliales la infección con rotavirus genera un aumento en la permeabilidad paracelular, una disminución de la TEER y una relocalización de las proteínas del AJC claudina-1, ocludina y ZO-1 (Estes & Morris, 1999; Obert *et al.*, 2000). La identificación de rafts como mediadores importantes de la entrada (Isa *et al.*, 2004), y salida (Chwetzoff & Trugnan, 2006; Cuadras *et al.*, 2006) de rotavirus, y la descripción del AJC como un tipo particular de raft (Nusrat *et al.*, 2000)), sugieren la posibilidad de que rotavirus requiera para su entrada de los complejos de adhesión localizados en los bordes celulares, como se describió para coxsackie-virus (Coyne *et al.*, 2006).

En otro trabajo (Ciarlet *et al.*, 2001), seis distintas líneas celulares polarizadas no mostraron cambios en la TEER ni en la permeabilidad a trazadores de bajo peso molecular, ocasionados por la infección de rotavirus sino hasta las 10 hpi. En ese mismo trabajo se notó que la salida del virus se encontraba polarizada a la cara apical y ocurría antes de la lisis celular, con lo cual se sugiere que los cambios estructurales y funcionales en las uniones intercelulares serían secundarios a la infección por el virus. Un enfoque metodológico que evaluase con mayor sensibilidad cambios en las funciones de las monocapas como barrera entre los compartimientos apical y basolateral, podría permitir detectar cambios en las primeras horas de infección que correlacionaran con entrada del virus. Metodologías para modular el AJC a través de tratamientos con EGTA o medios con

distintos niveles de calcio se conocen y son ampliamente usadas desde hace algún tiempo (Martinez-Palomo *et al.*, 1980, Nava *et al.*, 2004).

Existen reportes de incrementos de infectividad de varios virus debidos a la ruptura del mantenimiento de la polaridad epitelial a través de quelar el calcio extracelular con EGTA, el cual es necesario para la función de las uniones adherentes y uno de sus componentes, las cadherinas. En varios casos esto se ha tomado como prueba de que la infección sucede en forma polarizada en células epiteliales. Ejemplo de esto son adenovirus, cosackievirus, reovirus, poliovirus, hepatitis A y C, y herpesvirus; todos ellos exhiben interacciones a nivel apical que pueden asociarse con unión inicial de sus partículas, además de vías de penetración mediada por moléculas de distribución basolateral (Bomsel & Alfsen, 2003; González-Mariscal *et al.*, 2009).

El caso mejor estudiado es el del receptor de Coxsackie y Adenovirus (CAR), molécula que es parte del AJC (Walter *et al.*, 2002). Dado que CAR se encuentra oculta, adenovirus requiere la presencia de lesiones o discontinuidades para interactuar con la superficie basolateral y encontrar a su receptor, razón por la cual se cree que la liberación en exceso de su proteína de la fibra logra debilitar el AJC durante las primeras horas post infección, con la consecuente entrada masiva e infección generalizada del epitelio (Walter *et al.*, 2002). Muy recientemente se reportó la capacidad de rotavirus para establecer una infección sistémica (Azevedo *et al.*, 2005; Crawford *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2006), en caso de caracterizarse un mecanismo de entrada del virus que logre reconciliar esta información con su polaridad de infección, las implicaciones para el entendimiento de su patogénesis serían muy importantes. Existe una clara correlación entre patógenos que infectan a nivel apical y la naturaleza localizada de su efecto, mientras que aquellos que infectan a nivel basolateral, o alcanzan de alguna manera el compartimiento serosal de los epitelios, establecen infecciones sistémicas (Bomsel & Alfsen, 2003; Ramig, 2004, 2007).

En rotavirus el uso de AS terminal correlaciona con el tipo de proteína VP4 (Ciarlet *et al.*, 2001a). La dependencia de integrinas parece correlacionar también con el tipo de proteína VP4, sin embargo, se ha propuesto que se comporta independiente del uso de AS terminal. En nuestros resultados la magnitud del aumento de infectividad por exposición basolateral ante tratamiento con EGTA parece más relacionado con el uso de AS terminal, puesto que

este aumento fue mayor para las cepas Wa y UK, las cuales no lo requieren para la unión inicial. Aquellas cepas que se esperaba fuesen independientes de integrinas (TFR41 y UK) mostraron niveles distintos de aumento de infectividad por lo cual tal dependencia queda pendiente por ser esclarecida. Una posibilidad es que aquellas cepas que muestran menor aumento de infectividad (RRV, TFR41) usen estrategias de entrada alternativas que involucren además de moléculas basolaterales otras moléculas que sí sean accesibles a nivel apical, esto también podría explicar su mayor facilidad para propagación en cultivo, donde la cantidad de virus infeccioso de esas cepas sensibles a tratamiento con NA, suelen ser mayores comparados con los títulos observados con las cepas que no requieren AS terminal (Wa, UK).

Al evaluar directamente la polaridad de infección en soportes permeables con 3.0 μm de diámetro de poro se encontró que, no obstante las limitaciones a la difusión libre a través del soporte, con todas las cepas probadas se observa mayor infectividad cuando se incuba el virus desde la superficie basolateral. De la misma manera que el efecto de infectividad aumentada ante tratamiento con EGTA, este comportamiento no correlaciona con el uso de AS terminal ni integrinas, como se propone en MA104. Estos resultados sugieren que tal clasificación no aplica en el caso de células polarizadas MDCKII, las cuales se espera se acerquen más a las condiciones del epitelio intestinal, blanco *in vivo* al cual infecta rotavirus, en comparación con células en cultivo que no se polarizan espontáneamente como las que se usan para propagar rotavirus (MA104).

En células MA104 se propone que varios tipos de integrinas podrían servir como receptores para rotavirus. Entre ellas las más caracterizadas han sido las subunidades alfa2 y alfaVbeta3 (Isa *et al.*, 2008; López & Arias, 2004) que participan en un evento post-unión después de que el virus contacta el AS terminal a través de su proteína VP8* (caracterizado para la cepa RRV). A partir de este trabajo queda clara la importancia de estas moléculas para la infectividad de rotavirus en células MDCKII.

Las integrinas exhiben una distribución marcadamente polarizada hacia la región basolateral de las monocapas y por ende no estarían disponibles para las interacciones iniciales durante la infección por parte de patógenos entéricos. Los resultados hasta aquí presentados sugieren que la exposición de moléculas basolaterales sirve al virus para

aumentar su infectividad y entre ellas las integrinas serían candidatas obvias que resultarían expuestas como resultado del tratamiento.

Los resultados mostrados en este trabajo sugieren que las cepas de rotavirus probadas, en mayor o menor grado dependen de moléculas basolaterales para infectar, y todas usan integrinas durante el proceso de infección. Independientemente del mecanismo y el nivel al que sean requeridas las integrinas, rotavirus exhibe preferencia por infectar desde la región basolateral de las monocapas de células polarizadas

La identificación de los receptores virales ha permitido entender los mecanismos que tienen algunos virus para entrar a las células. De esta forma es posible diseñar herramientas que controlen la infección por estos patógenos. En muchos casos estos receptores han resultado ser proteínas implicadas en la adhesión célula-célula. Por ejemplo los rinovirus se unen a la molécula de adhesión intercelular ICAM-1, el virus α -herpes se une a una proteína de la unión adherente parecida al receptor del poliovirus (Prr1), coxsackievirus B y adenovirus 2 y 5 se unen a la proteína CAR (Bergelson et al., 1997), y los reovirus se asocian con la proteína JAM (Barton *et al.*, 2001), estas dos últimas asociadas con el AJC. Para rotavirus la definición de su receptor ha sido un área muy difusa de investigación. Se considera que esto es resultado de la alta complejidad en las interacciones iniciales con sus células blanco.

En este estudio se ha podido contribuir al conocimiento de la polaridad de infección de rotavirus hacia monocapas de células de un linaje celular que se polariza espontáneamente mediante cultivo *in vitro*; se valoró la importancia de dos moléculas que previamente se encontró que juegan el papel de receptores en otro linaje celular no polarizado en cultivo; y se detectó que aumentos de infectividad resultantes del relajamiento de la función de barrera podrían deberse a un incremento de la unión del virus a las células (eventos post-unión). Acercamientos experimentales como el llevado a cabo aquí, podrían brindar información importante para entender la patogénesis de rotavirus hacia su epitelio blanco con estrategias metodológicas relativamente simples.

CONCLUSIONES

Como resultado de este estudio se ha podido concluir:

- Las cepa de rotavirus RRV exhibe el mismo fenotipo ante tratamiento con neuraminidasa sobre monocapas de células MDCKII polarizadas comparado con su fenotipo en células MA104.
- El aumento de infectividad por efecto del tratamiento con EGTA podría ser producto de un evento post-unión principalmente, con un componente menor al facilitar la unión inicial a la célula.
- Las cepas de rotavirus Wa, UK, TFR41 y RRV infectan mejor por la superficie basolateral en monocapas de células MDCKII.
- Las integrinas alfa2beta1 y alfaVbeta3 son necesarias para la infección de las cepas de rotavirus Wa, UK, TFR41 y RRV en células MDCKII.

REFERENCIAS

Arias CF, P Romero, V Alvarez, and S Lopez. 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol* 70:5832-9.

Arias, CF, P Isa, CA Guerrero, E Méndez, S Zárate, T López; R Espinosa, P Romero, and S López. 2002. Molecular biology of rotavirus cell entry. *Arch Med Res* 33: 356-361.

Arias CF, Pérez-Vargas J, y López S. 2009. La Familia Reoviridae. En: *Microbiología Médica*. Manjarrez, M.A (ed.). Méndez Editores. Cd. de México.

Ayala-Bretón C, Arias M, Espinosa R, Romero P, Arias CF, and S López. 2009. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNAi. *J Virol*. 83:8819-8831.

Banda, K, G Kang, and A. Varki. 2009. "Sialidase sensitivity" of rotaviruses revisited. *Nature Chemical Biology* 5(2):71-72.

Barazi HO, L Zhou, NS, Templeton HC, Krutzsch, and DD Roberts. 2002. Identification of heat shock protein 60 as a molecular mediator of alpha3beta1 integrin activation. *Cancer Res* 62:1541-1548.

Barton ES, JC Forrest, JL Connolly, JD Chappell, Y Liu, FJ Schnell, A Nusrat, CA Parkos, and TS Dermody. 2001. Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* 104:441-451.

Bass DM, MR Baylor, C Chen, EM Mackow, M Bremont, and HB Greenberg. 1991. Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J Clin Inv* 90:2313-2320.

Beaulieu, and Jean-Francois. 1992. Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human intestine. *J Cell Sci* 102:427-436.

Belnap, DM, DJ Filman, BL Trus, N Cheng, FP Booy, JF Conway, S Curry, CN Hiremath, SK Tsang, AC Steven, and JM Hogle. 2000. Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. *J Virol* 74:1342-1354.

Blanchard H, X Yu, B.S. Coulson, and M. Von Itzstein. 2007. Insight into host cell carbohydrate-recognition by human and porcine rotavirus from crystal structures of the virion spike associated carbohydrate-binding domain (VP8*). *J Mol Biol* 367:1215-1226.

Blau D.M, and R.W. Compans. 1996. Polarization of viral entry and release in epithelial cells. *Sem Virol* 7:245-253.

Bomsel, M and A Alfsen. 2003. Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:57-68.

Broquet AH, G Thomas, J Masliah, G Trugnan, and M Bachelet. 2003. Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. *J Biol Chem* 278: 21601– 21606.

Campbell JA, P Schelling, JD Wetzel, EM Johnson, JC Forrest, GAR Wilson, M Aurrand-Lions, BA Imhof, T Stehle and TS Dermody. 2005. Junctional adhesion molecule A serves as a receptor for prototype and field-isolate strains of mammalian reovirus. *J Virol* 79:7967-7978.

Cereijido M, RG Contreras and L Shoshani. 2004. Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiol Rev* 84:1229-1262.

Charpilienne A, M Nejmeddine, M Berois, N Parez, E Neumann, E Hewat, GTrugnan 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.

Chazal N, and D Gerlier. 2003. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:226-237.

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

Chwetzoff S and G Trugnan. 2006. Rotavirus assembly: An alternative model that utilizes an atypical trafficking pathway. *CTMI* 309:245-261.

Ciarlet M and MK Estes. 1999. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J Gen Virol* 80:943-948.

Ciarlet M and MK Estes. 2001a. Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells. *Curr opinion Microbiol* 4:435-441.

Ciarlet M AE Crawford and MK Estes. 2001b. Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. *J Virol* 75:11834-11850.

Ciarlet M, SE Crawford, E Cheng, SE Blutt, DA Rice, JM Bergelson and MK Estes. 2002a. VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. *J Virol* 76:1109-1123.

Ciarlet M, JE Ludert, M Iturriza-Gómara, F Liprandi, JJ Gray, U Desselberger and M.K. Estes. 2002b. Initial interaction of Rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid

residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *J Virol* 76:4087-4095.

Constenla D, FR Velásquez, RD Rheingans, L Antil and Y Cervantes. 2009. Economic impact of a rotavirus vaccination program in Mexico. 2009. *Rev Panam Salud Publica* 25:481-490.

Corvera S, C DiBonaventura and HS Sheptner. 2000. Cell confluence-dependent remodeling of endothelial membranes mediated by cholesterol. *J Biol Chem* 275:31414-31421.

Coyne CB and JM Bergelson. 2006. Virus-induced abl and fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124:119-131.

Coulson BS, 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.

Crawford SE, DG Patel, E Cheng, Z Berkova, JM Hyser, M Ciarlet, MJ Finegold, ME Conner and MK Estes. 2006. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. *J Virol* 80:4820-4832.

Cuadras MA, and HB Greenberg. 2003. Rotavirus infectious particles use lipid rafts during replication for transport to the cell surface in vitro and in vivo. *Virology* 313: 308– 321.

Cuadras MA, BB Bordier, JL Zambrano, JE Ludert and HB Greenberg. 2006. Dissecting rotavirus particle-raft interaction with small interfering RNAs: Insights into rotavirus transit through the secretory pathway. *J Virol* 80:3935-3946.

Delorme C, H Brussow, J Sidoti, N Roche, KA Karlson, JR Neeser and S Teneberg. 2001. Glycosphingolipid binding specificities of rotavirus: Identification of a sialic acid-binding epitope. *J. Virol* 75:2276-2287.

Dickman KG, SJ Hempson, J Anderson, S Lippe, L Zhao, R Burakoff and RD Shaw. 2000. Rotavirus alters paracellular permeability and energy metabolism in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastroenterol Liver Physiol* 279:G757-G766.

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.

Dormitzer PR, EB Nason, BV Venkataram Prasad and SC Harrison. 2004. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* 430:1053-1058.

Estes, M. K. 2001. Rotaviruses and their replication. In B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, D.E. Griffin; R.A. Lamb; B. Roizman; and S. E. Straus (eds), *Virology* 2:1747-1786. Raven Press, New York.

Estes MK and AP Morris. 1999. A viral enterotoxin. A new mechanism of virus-induced pathogenesis. *Adv Exp Med Biol* 473:73-82.

Fenaux M, MA Cuadras, N Feng, M Jaimes and HB Greenberg. 2006. Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice. *J Virol* 80:5219-5232.

Fukudome K, O Yoshie and T Konno. 1989. Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. *Virology* 172:196-205.

Fuentes-Panana E, MS Lopez, M Gorziglia and CF Arias. 1995. Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses. *J Virol* 69:2629-32.

Fuller S, C-H von Bonsdorff and K Simons. 1984. Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the polarized cell line MDCK. *Cell* 38:65-77.

García-Escamilla, David. 2004. <http://www.gsk.com.mx/news/Rotarix.html>

Gonzalez-Mariscal L, E Garay and S Lechuga. 2009. Virus interactions with the apical junctional complex. *Frontiers in Bioscience* 14:731-768.

Gout SP, MR Jacquier-Sarlin, R Louard-Talbot, P Rousselle and MR. Block. 2001. Rho-dependent switch between alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins is induced by laminin-5 during early stage of HT-29 cell differentiation. *Mol Biol Cell* 12:3268-3281.

Graham KL, P Halasz, M.J Hewish Y, Takada ER Mackow, MK Robinson and BS Coulson. 2003. Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *J Virol* 77:9969-9978.

Graham KL, W Zeng, Y Takada, DC Jackson and BS Coulson. 2004. Effects on rotavirus cell binding and infection of monomeric and polymeric peptides containing alpha2beta1 and alphaXbeta2 integrin ligand sequences. *J Virol* 78:11786-11797.

Graham KL, FE Fleming, P Halasz, MJ Hewish, HS Nagesha, IH Holmes, Y Takada and B.S. Coulson. 2005. Rotaviruses interact with alpha4beta7 and alpha4beta1 integrins by binding the same integrin domains as natural ligands. *J Virol* 86:3397-3408.

Graham KL, Y Takada and BS Coulson. 2006. Rotavirus spike protein VP5* binds alpha2beta1 integrin on the cell surface and competes with virus for cell binding and infectivity. *J Gen Virol* 87:1275-1283.

- Guerrero CA, S Zárate, G Corkidi, S López and CF Arias. 2000a. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J Virol* 74:9362-9371.
- Guerrero CA, E Mendez, S Zarate, P Isa, S Lopez, and CF Arias. 2000. Integrin alpha(V)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14644-9.
- Guerrero CA, Bouyssounade S Zárate, P Isa, T López, R Espinosa, P Romero, E Méndez, S López and CF Arias. 2001. The heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J Virol* 76:4096-4102.
- Gutiérrez M, P Isa, C Sánchez-San Martín, J Pérez-Vargas, R. Espinosa, CF Arias and S.López. 2010. Different rotavirus strains may enter MA104 cells through different endocytic pathways: The role of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*. Enviado.
- Haselhorst T, FE Fleming, JC Dyason, RD Hartnell, X. Yu, G Holloway, K Santegoets, MJ Kiefel, H Blanchard, BS Coulson and M von Itzstein. 2009. Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nat Chem Biol* 5:91-93.
- 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-
- 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.
- Isa P, S López, L Segovia, and C F Arias. 1997. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J Virol* 71:6749-56.
- Isa P, M Realpe, P Romero, S López and CF Arias. 2004. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* 322:370-381.
- Isa P, Gutiérrez M, Arias CF, and López S. 2008. Rotavirus cell entry. *Future Virol*, 3:135-146.
- Isa P, Sánchez-Alemán MA, López S, and CF Arias. 2009. Dissecting the role of integrin subunits alpha 2 and beta 3 in rotavirus cell entry by RNA silencing. *Virus Res* 145:251-259.
- Ivanov A.I, A Nusrat and CA Parkos. 2004a. Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol Bio Cell* 15:176-188.
- Ivanov AI, IC McCall, CA Parkos and A Nusrat. 2004b. Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Bio Cell* 15:2639-2651.

- Ivanov A.I, A Nusrat and C.A. Parkos. 2005. Endocytosis of the apical junctional complex: mechanism and possible roles in regulation of epithelial barriers. *Bioassays* 27:356-365.
- Jayaram H, M.K. Estes and B.V. Venkataram Prasad. 2004. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res* 101:67–81.
- Kaljot KT, RD Shaw, DH Rubin, and HB Greenberg. 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol* 62:1136-44.
- Kapikian AZ, Y Hoshino and RM Chanock. 2001. Rotaviruses. In B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, D.E. Griffin; R.A. Lamb; B. Roizman; and S. E. Straus (eds), *Virology* 2:1787-1833. Raven Press, New York.
- Kovbasnjuk O.N, and KR Spring. 2000. The apical membrane glycocalix of MDCK cells. *J Membrane Biol* 176:19-29.
- Lawton JA, MK Estes, and BV Prasad. 1997. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Biol* 4:118-21.
- Londrigan S.L.; K.L. Graham; Y. Takada; P.Halasz; and B.S. Coulson. 2003. Monkey rotavirus binding to alpha2beta1 integrin requires the alpha2 I domain and is facilitated by the homologous beta1 subunit. *J Virol* 77:9486-501.
- López T, M Camacho, M Zayas, R Nájera, R Sánchez, CF Arias and S López. 2004. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J Virol* 79:184-192.
- López, JA, AJ Maldonado, M Gerder, J Abanero, J Murgich, FH Pujol, F Liprandi and JE Ludert. 2005. Characterization of neuraminidase-resistant mutants derived from rotavirus porcine strain OSU. *J Virol* 79:10369-10375.
- López S, and Arias CF. 2003. Attachment and post-attachment receptors for rotavirus. In: U. Desselberger and J Gray (Eds), *Viral Gastroenteritis*, Elsevier Science, Amsterdam.
- López S and CF Arias. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a versaillesque dance. *Trends Microbiol* 12:271-278.
- López S and CF Arias. 2006. Early steps in rotavirus cell entry. *Current topics in Microbiology and Immunology* 309:39-66.
- Lorrot M and M Vasseur. 2007. Physiopathology of Rotavirus diarrhea. *Archives de Pédiatrie* 14:S145-51.
- Ludert JE, BB Mason, J Angel, B Tang, Y Hoshino, N Feng, P T Vo, E M.Mackow, F M Ruggeri, and H Greenberg. 1998. Identification of mutations in the rotavirus protein VP4 that alter sialic-acid-dependent infection. *J Gen Virol* 79:725-9.

Ludert JE, MC Ruiz, C Hidalgo and F Liprandi. 2002. Antibodies to rotavirus capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsidation. *J Virol* 76:6643-6651.

Lussier C, N Basora, Y Bouatrous and JF Beaulieu. 2000. Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestine mucosal. *Microsc. Res. Technol.* 51:169-178.

Mackow ER, RD Shaw, SM Matsui, PT Vo, MN Dang and HB Greenberg. 1988. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: Location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:645-649.

Maginnis MS, J C Forrest, SA Kopecky-Bromberg, SK Dickeson, SA Santoro, MM Zutter, GM Nemerow, JM Bergelson and TS Dermody. 2006. Beta1 integrins mediate internalization of mammalian reovirus. *J Virol* 80:2760-2770.

Maginnis MS, JC Forrest, SA Kopecky-Bromberg, SK Dickeson, SA Santoro, MM Zutter, GM Nemerow, JM Bergelson and TS Dermody. 2006. Beta1 integrins mediate internalization of mammalian reovirus. *J Virol* 80:2760-2770.

Martinez-Palomo A, I Meza, G Beaty and M Cerejido. 1980. Experimental modulation of occluding junctions in a cultured transporting epithelium. *J Cell Biol* 87:736-745.

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

Matsuda M, A. Kubo, M Furuse and S Tsukita. 2003. A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *J Cell Sci* 117:1247-1257.

Méndez E, CF Arias and S López. 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J Virol* 67:5253-5259.

Méndez E, CF Arias and S López. 1996. Interaction between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J Virol* 70:1218-1222.

Méndez E, S López, MA Cuadras, P Romero and CF Arias. 1999. Entry of rotavirus is a multistep process. *Virology* 263:450-459

Miyoshi J and Y Takai. 2005. Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv Drug Deliv Reviews* 57:815-855.

Monnier N, KH Moriguchi, Z-Y Sun, BV Venkataram Prasad, K Taniguchi and P R Dormitzer. 2006. High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain. *J Virol* 80:1513-1523.

Morris AP and MK Estes. 2001. Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial-Mucosal Interactions VIII. Pathological consequences of rotavirus infection and its enterotoxin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G303–G310.

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.

Nava P, S López, CF Arias, S Islas and L González-Mariscal. 2004. The rotavirus surface protein VP8* modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Sci* 117:5509-5519.

Nusrat A, CA Parkos, P Verkade, CS Foley, TW Liang, W Innis-Whitehouse and KK Eastburn. 2000. Tight junctions are membrane microdomains. *J Cell Sci* 113:1771-1781.

Obert G, I Peiffer and AL Servin. 2000. Rotavirus-induced structural and functional alterations in tight junctions of polarized intestinal Caco-2 cell monolayers. *J Virol* 74:4645-4651.

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.

Parashar UD, JS Bresee, JR Gentsch and RI Glass. 1998. Rotavirus. *Emerg Infect Dis* 4:561-70.

Parashar UD, EG Hummelman, J S Bresee, MA Miller and RI Glass. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 9:565-72.

Parashar UD, CJ Gibson, JS Bresee and RI Glass. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12:304-306.

Pérez-Vargas J, P Romero, S López, and C.F. Arias. 2006. The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity. *J Virol* 80:3322-31.

Pesavento J. B, SE Crawford, E. Roberts, MK Estes and B. V. Venhataram Prasad. 2005. pH-induced conformational change of the rotavirus VP4 spike: implications for cell entry and antibody neutralization. *J Virol* 79:8572-80.

Praetorius J, P Backlund, A.L. Yergey and K.R. Spring. 2001. Specific lectin binding to beta1 integrin and fibronectin on the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Mem Biol* 184:273-281.

Ramig R. F. 2004. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 78:10213-20.

Ramig,R. F. 2007. Systemic rotavirus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5(4): 591-612.

Realpe M, R Espinosa, López S and C.F. Arias. 2010. Rotaviruses require basolateral molecules for efficient infection of polarized MDCKII cells. *Virus Res* 147:231-241.

Rey F.A. 2009. Single-particle cryoEM reconstructions: Meeting the challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:10398-10399.

Richardson V, J. Hernandez-Pichardo, M. Quintanar-Solares, M. Esparza-Aguilar, B. Jonson, C.M. Gomez-Altamirano, U. Parashar and M. Patel. 2010. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *N Engl J Med* 362:299-305.

Rolsma M.D, T.B. Kuhlenschmidt, H.B. Gelber and M.S. Kuhlenschmidt. 1998. Structure and function of a ganglioside receptor for porcine rotavirus. *Journal of Virology* 72:9079-9091.

Sánchez-San Martín C, T Lopez, C. F. Arias, and S. Lopez. 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol* 78:2310-2318.

Sears C.L. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions V. Assault of the tight junction by enteric pathogens. 2000. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G1129-34.

Seo Neung-Seon, C.Q.Y. Zeng, J.M. Hyser, B. Utama, S.E. Crawford, K.J. Kim, M. Hook, and M.K. Estes. 2008. Integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 are receptors for the rotavirus enterotoxin. *PNAS* 105:8811-8818.

Svensson L, B.B. Finlay, D Bass, C.H. Von Bonsdorff and H.B. Greenberg. 1991. Symmetric Infection of Rotavirus on Polarized Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells. *J Virol* 65:4190-4197.

Tafazoli F, CQ Zeng, MK Estes, K-E Magnusson and L. Svensson. 2001. NSP4 Enterotoxin of Rotavirus Induces Paracellular Leakage in Polarized Epithelial Cells. *J Virol* 75:1540-1546.

Ulloa F and F Real. 2001. Differential distribution of sialic acid in 2,3 and 2,6 linkages in the apical membrane of cultured epithelial cells and tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 49:501-509.

Walters R.W, P Freimuth, T.O. Moninger, I. Ganske, J. Zabner, and M.J. Welsh. 2002. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 110:789-799.

WHO. 2007. *Weekly epidemiological record* 82:285-296.

Yoder J.D, and P.R. Dormitzer. 2006. Alternative intermolecular contacts underlie the rotavirus VP5* two- to three-fold rearrangement. *EMBO* 1-10.

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.

Zárate S, R. Espinosa, P. Romero, E. Méndez, C.F. Arias, and S López. 2000a. The VP5* domain of VP4 can mediate attachment of rotavirus to cells. *J Virol* 74:593-599.

Zárate S, R Espinosa, P Romero, C.A. Guerrero, C.F. Arias, and S. López. 2000b. Integrin $\alpha 2\beta 1$ mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology* 278:50-54.

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

Zarate S, P Romero, R Espinosa, C.F. Arias, and S Lopez. 2004. VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin $\alpha v\beta 3$ through a novel integrin-binding site *J Virol* 78: 10839-10847.

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.