



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DE LA
PROTEÍNA VP2 DE ROTAVIRUS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA

BIOL. MARÍA DE LOURDES VALLEJO ESPÍ

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS PADILLA NORIEGA

México, D. F.

Agosto 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis fue financiada parcialmente por los proyectos:

51029-Z, del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México.

IN224809 e IN210906 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por la grandiosa formación académica.

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas

Al CONACYT por la beca otorgada registro 221024

A los miembros del Comité Tutoral integrado por: el Dr. Luis Padilla Noriega, la Dra. Rosa Estela Navarro y la Dra. Ma. Imelda López Villaseñora por su valiosa dirección en la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado por la revisión del manuscrito y sus importantes observaciones:

Dra. María Imelda López Villaseñor

Dr. Ernesto Méndez Salinas

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Dr. Juan Miranda Ríos

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera

Al Dr. Luis Padilla Noriega, por permitirme trabajar en su laboratorio, por su confianza, apoyo y asesoría en todo momento.

Al Dr. Renato León Rodríguez, a la Dra. Eloísa Hernández Lucero y a la BQ. Laura Martínez Alvarez por su orientación y apoyo durante estos dos años.

Al Biol. Gabriel Orozco Hoyuela por su asesoría en el uso del microscopio de epifluorescencia.

Dedicatorias

A mis Padres

Lourdes Espí Chávez y Jorge Vallejo González por todo su cariño y apoyo incondicional.

A mi Hermana

Carolina Vallejo por ser la mejor hermana del mundo y por creer siempre en mí.

A Mario Sota

Por ser mi mejor amigo y pareja antes, durante y después de la realización de este proyecto. Por compartir sus sueños y los míos y por ayudarme a que se vuelvan realidad.

*El que pretende lo inalcanzable
es más fuerte que el destino.*

- Stefan Zweig

ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN
INTRACELULAR DE LA PROTEÍNA
VP2 DE ROTAVIRUS

ÍNDICE

I.	Abreviaturas	8
II.	Índice de Figuras	10
III.	Índice de Tablas	13
IV.	Resumen	14
V.	Introducción	16
1.	Epidemiología	16
	<i>a) Morbilidad y mortalidad a nivel mundial</i>	16
	<i>b) Morbilidad y mortalidad en México</i>	17
2.	Generalidades de rotavirus	18
	<i>a) Clasificación</i>	18
	<i>b) Estructura y organización del genoma</i>	18
	<i>c) Estructura del virión</i>	21
	<i>d) Viroplasmata</i>	24
	<i>e) Proteínas virales</i>	24
	<i>i) Proteínas estructurales</i>	24
	<i>ii) Proteínas no estructurales</i>	29
3.	Estadios de replicación	32
	<i>a) Adsorción, penetración y pérdida de la capa externa</i>	32
	<i>b) Transcripción, traducción y replicación</i>	34
	<i>c) Encapsidación del RNA y ensamble del virión</i>	37
	<i>d) Liberación del virión maduro</i>	38
4.	Partículas defectivas interferentes	40
5.	Mecanismos de neutralización por anticuerpos monoclonales anti-rotavirus	42
VI.	Justificación	43
VII.	Objetivos	44
VIII.	Hipótesis	45
IX.	Metodología General	46

1) Cultivo de células de mamífero.....	46
2) Inmunofluorescencia de células MA-104 y BS-C-1 infectadas por rotavirus SA11 a un solo tiempo post-infección.....	46
3) Inhibición de la entrada de partículas virales a la célula en tiempos posteriores a 1 hora post-adición del virus.....	47
4) Cinética de la distribución de VP2 en células BS-C-1 infectadas por rotavirus y tratadas con EGTA y el anticuerpo monoclonal 4F8.....	49
5) Expresión de VP2 en células MA-104 y BS-C-1 mediante un sistema del vaccinia recombinante	51
a) Sistema del virus vaccinia recombinante	51
b) Inmunofluorescencia de VP2 en células infectadas por el virus vaccinia recombinante vSA2	52
6) Expresión de VP2, NSP2 y NSP5 en células BS-C-1 mediante un sistema híbrido de vaccinia.....	53
a) Sistema híbrido de vaccinia.....	53
b) Inmunofluorescencia de VP2 y NSP2 en células que expresan a VP2, NSP2 y NSP5 a través del sistema híbrido de vaccinia	53
X. Resultados.....	55
1) Distribución intracelular de VP2 en células MA-104 y BS-C-1 infectadas por SA11 a las 18 h post-infección.....	55
2) Cinética de la distribución de VP2.....	58
a) Inhibición de la entrada de partículas virales a la célula en tiempos posteriores a 1 hora post-adición del virus	58
b) Cinética de la distribución de VP2 en células BS-C-1 infectadas por SA11 y tratadas con EGTA y el anticuerpo monoclonal neutralizante 4F8.....	61
• Proporción de células con VP2 distribuida de forma difusa y proporción de células con VP2	

	<i>distribuida de forma “difusa más agregados” en distintos tiempos post-infección.</i>	62
•	<i>Comparación entre los patrones de distribución de VP2 y la morfología de los viroplasma</i>	65
•	<i>Proporción de células con VP2 distribuida de forma difusa al incrementar la multiplicidad de infección</i>	68
•	<i>Número de agregados de VP2 que colocalizan y que no colocalizan con NSP2 por tiempo post-infección</i>	69
•	<i>Área de los agregados de VP2 y de NSP2 por tiempo post-infección.</i>	77
•	<i>Área de los agregados formados sólo por VP2 y distancia al viroplasma más cercano.</i>	79
•	<i>Descripción de agregados formados por NSP2 pero no por VP2.</i>	80
•	<i>Relación entre la señal de VP2 difusa y la señal de VP2 que forma agregados por célula.</i>	82
•	<i>Descripción de la heterogeneidad de la infección viral.</i>	85
3)	<i>Expresión de VP2 en células MA-104 y BS-C-1 mediante un sistema del virus vaccinia recombinante.</i>	88
4)	<i>Expresión de VP2, NSP2 y NSP5 en células BS-C-1 mediante un sistema híbrido del virus vaccinia.</i>	90
•	<i>Eficiencia de reclutamiento de VP2 en las estructuras semejantes a viroplasma.</i>	96
XI.	Discusión	98
XII.	Conclusiones	107
XIII.	Apéndice de medios y soluciones	108
XIV.	Literatura citada	112

I. Abreviaturas

AMC	anticuerpo monoclonal
ATP	adenosil trifosfato
ATPasa	adenosil trifosfatasa
DI	defectivas interferentes
DLP	partícula de doble capa
DNA	ácido desoxirribonucleico
EGTA	etilenglicol ácido tetracético
ER	retículo endoplásmico
HTH	hélice-giro-hélice
h PI	hora post-infección
IF	inmunofluorescencia/inmunofluorescente
IPTG	isopropil tiogalactósido
kDa	kilodalton
MEM	<i>Minimum Eagle's Medium</i>
MOI	multiplicidad de infección
NDP	nucleótido difosfato
NTP	nucleótido trifosfato
NTPasa	nucleótido trifosfatasa
PABP	proteína de unión a poli(A)
PAP	peroxidasa/antiperoxidasa
PFA	paraformaldehído
RI	intermediario de la replicación
RNA	ácido ribonucleico
RNAcd	RNA de cadena doble
RNAcs	RNA de cadena sencilla
RNAm	RNA mensajero
SLP	partícula de una sola capa
t PI	tiempo post-infección

TA	temperatura ambiente
TLP	partícula de triple capa
UFF	unidades formadoras de focos
UFP	unidades formadoras de placas
VLS	estructuras semejantes a viroplasma

II. Índice de Figuras

Figuras de la Introducción

No. Fig.	No. Pág.
1. Distribución global estimada de muertes originadas por rotavirus	16
2. Genoma de rotavirus, proteínas que codifica e imagen reconstruida del virión.....	19
3. Principales características de la estructura de los genes de rotavirus.....	20
4. Patrón electroforético de los segmentos de RNA de rotavirus.....	21
5. Microscopía electrónica de partículas de rotavirus	22
6. Propiedades biológicas y estructurales de rotavirus.....	23
7. Dominios estructurales y funcionales de la proteína VP2.....	26
8. VP2 se ubica en los viroplasmos	27
9. Distribución diferencial de VP2 y de NSP2.....	28
10. Colocalización de NSP2 y NSP5 en viroplasmos	31
11. Formación de estructuras semejantes a viroplasmos a partir de NSP2 y NSP5	31
12. Modelos propuestos para la entrada de rotavirus a la célula.....	33
13. Principales características del ciclo replicativo de rotavirus.....	39

Figuras de la Metodología

14. Sistema de expresión VOTE	51
-------------------------------------	----

Figuras de los Resultados

15. VP2 forma agregados que se ubican en viroplasmos	56
16. Distribución de VP2 en células MA-104 y BS-C-1 infectadas por SA11.....	57
17. Efecto del EGTA y del anticuerpo monoclonal (AMC) 4F8 sobre el virus previo	

a la infección	59
18. Efecto del EGTA y del AMC 4F8 sobre el virus posterior a la infección.....	60
19. Patrones de distribución de VP2	63
20. Proporción de células con VP2 difusa y con VP2 difusa más agregados por tiempo post-infección en infecciones tratadas con EGTA y el AMC 4F8	64
21. Proporción de células con VP2 difusa y con VP2 difusa más agregados por tiempo post-infección en infecciones no tratadas con EGTA y el AMC 4F8.....	64
22. Comparación entre los patrones de distribución de VP2 y la morfología de los viroplasmos en infecciones no tratadas con EGTA y el AMC 4F8	66
23. Comparación entre los patrones de distribución de VP2 y la morfología de los viroplasmos en infecciones tratadas con EGTA y el AMC 4F8	67
24. Proporción de células con VP2 distribuida de forma difusa al infectar con multiplicidades de infección cada vez mayores y tratar con EGTA y el AMC 4F8.....	69
25. Colocalización de agregados VP2 con agregados de NSP2 (viroplasmos).....	71
26. Colocalización de agregados VP2 con agregados de NSP2 por microscopía confocal	73
27. Comparación entre la colocalización y la no colocalización de VP2 y NSP2.....	76
28. Área de los agregados formados por VP2 y por NSP2	77
29. La localización de VP2 en los viroplasmos es central.....	79
30. Área de los agregados formados sólo por VP2	79
31. Distancia de los agregados de VP2 al viroplasma más cercano	80
32. Agregados de NSP2 que carecen de VP2.....	81
33. Señal inmunofluorescente de VP2 difusa y de VP2 que forma agregados por célula	82
34. Relación entre la señal inmunofluorescente de VP2 difusa de VP2 que forma agregados por célula	83
35. Señal inmunofluorescente de NSP2 difusa y de NSP2 que forma agregados por célula	84
36. Relación entre la señal inmunofluorescente de NSP2 difusa de NSP2 que forma	

agregados por célula.....	84
37. Comparación entre la señal inmunofluorescente de VP2 y de NSP2 difusa y la señal inmunofluorescente de ambas proteínas que forma agregados.....	85
38. La infección por rotavirus es heterogénea.....	87
39. Expresión de VP2 mediante el sistema de vaccinia recombinante.....	89
40. Expresión individual de VP2 y de NSP2 mediante el sistema híbrido de vaccinia.....	91
41. Coexpresión de NSP2 y NSP5 mediante el sistema híbrido de vaccinia.....	92
42. Coexpresión de VP2 y NSP2 o de VP2 y NSP5 mediante el sistema híbrido de vaccinia.....	93
43. Coexpresión de VP2, NSP2 y NSP5 mediante el sistema híbrido de vaccinia.....	94
44. Microscopía confocal de las estructuras semejantes a viroplasmias formadas por la coexpresión de VP2, NSP2 y NSP5.....	95
45. La fracción de estructuras semejantes a viroplasmias que recluta a VP2 es alta ...	96
46. Relación entre la señal inmunofluorescente de VP2 que forma las estructuras semejantes a viroplasmias y la señal inmunofluorescente de VP2 difusa.....	97

III. Índice de Tablas

Introducción

1. Características generales de rotavirus.....	23
--	----

IV. Resumen

El rotavirus tiene un diámetro de 70 nm y está formado por tres capas concéntricas de proteínas. La proteína VP2 es el principal componente de la capa interna o “core” y junto con las proteínas VP1 y VP3 envuelven al RNA de cadena doble (RNAd) genómico. VP2 es capaz de interactuar con RNAd y RNA de cadena sencilla (RNAs) así como con las proteínas virales VP1, VP3 y NSP5. VP2 también es cofactor de la actividad replicasa de VP1, que cataliza la producción de RNAd genómicos a partir de RNA mensajeros virales y además incrementa la vida media de estos mensajeros. La replicación y el ensamblaje viral ocurre en estructuras perinucleares, esféricas y electrodensas conocidas como viroplasmatas. La expresión sólo de NSP5 o la coexpresión de NSP5 junto con NSP2 o con VP2 da lugar a la formación de estructuras semejantes a viroplasmatas (VLSs). En el presente estudio nos propusimos determinar la cinética en la distribución de la proteína VP2 a lo largo de la infección por rotavirus. Mediante microscopía de fluorescencia confocal encontramos que VP2 se ubica en los viroplasmatas y que la fracción predominante de VP2 se distribuye de forma difusa en el citosol, i.e. más del 90% a las 12 horas post-infección (h PI), lo cual sugiere que podría desempeñar funciones diferentes a la replicación en el citoplasma y podría representar una evidencia más que apoya a la sugerencia previamente hecha de que VP2 participa en la regulación de la vida media de los mensajeros virales. Asimismo, existen pequeños agregados minoritarios de VP2 que no colocalizan con viroplasmatas y cuya función es desconocida. Del mismo modo, encontramos que a multiplicidades de infección bajas una muy pequeña proporción de las células infectadas carecen de VP2 en viroplasmatas, y los viroplasmatas visualizados con anti-NSP2 presentan una morfología aberrante. A multiplicidades de infección altas se incrementa la fracción de células con morfología aberrante de viroplasmatas. Estos resultados sugieren que en cierta proporción las infecciones por rotavirus no son exitosas. Una posible explicación a lo anterior sería la infección de una misma célula por partículas defectivas interferentes (DI) y silvestres lo cual daría lugar al fenómeno conocido como interferencia, ya que en estas condiciones las partículas DI dominan sobre las silvestres y esto culmina en infecciones no exitosas. Sin embargo, no podemos descartar otras posibilidades que podrían estar afectando el éxito de la infección viral como es la etapa del ciclo celular en la que se encuentra la célula al momento de la infección. Finalmente, encontramos que VP2 logra

ser reclutada a los VLSs. En conjunto, estos resultados sugieren que la proteína VP2 además de localizarse en viroplasma, presenta también otros patrones de distribución que no habían sido descritos. Asimismo, apuntan a que algunas infecciones por rotavirus son no productivas. La falla de VP2 de incorporarse a viroplasma podría ser un marcador de la ocurrencia de este fenómeno.

V. Introducción

1. Epidemiología

a) Morbilidad y mortalidad a nivel mundial

Los rotavirus del grupo A son el principal agente etiológico de gastroenteritis severa en niños menores de cinco años. Su distribución es mundial causando cada año aproximadamente 111 millones de episodios de gastroenteritis que sólo requieren reposo en casa, 25 millones de infecciones que requieren visitas clínicas, 2 millones de hospitalizaciones y, en promedio, 440,000 muertes de niños menores a cinco años (Figura 1). A la edad de 5 años, cada niño habrá experimentado un episodio de gastroenteritis por rotavirus, uno de cada cinco visitará al médico, uno de cada 65 será hospitalizado y uno de cada 293 fallecerá (Parashar *et al.*, 2003).

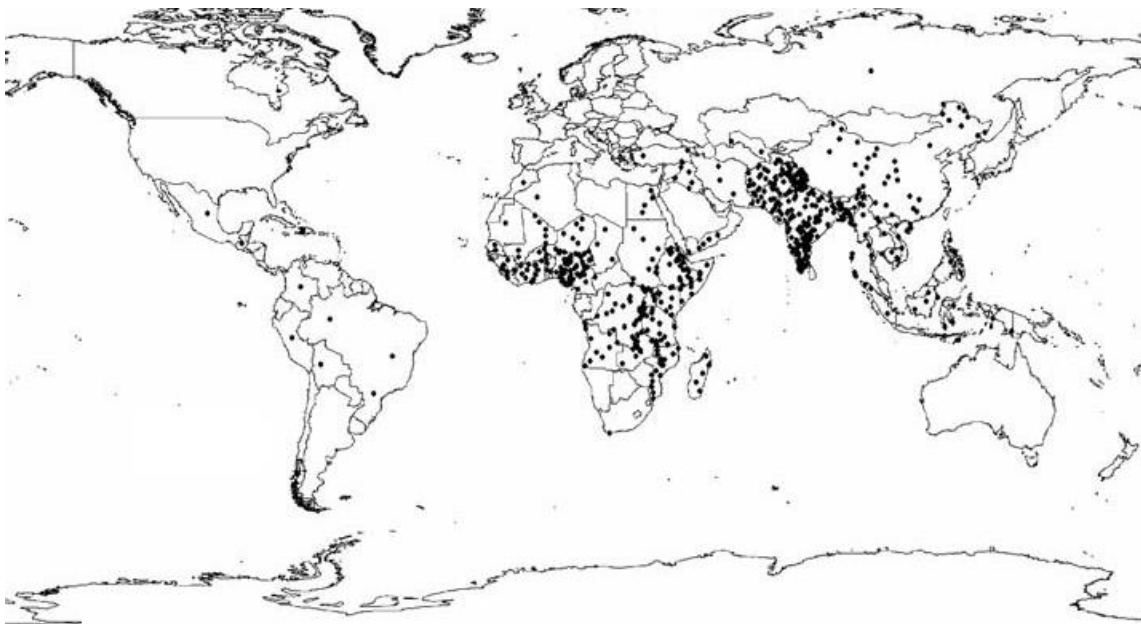


Figura 1. Distribución global estimada de muertes originadas por rotavirus anualmente. Cada punto representa mil muertes (Tomado de Parashar *et al.*, 2006).

En Estados Unidos, los rotavirus causan del 5% al 10% de los episodios de diarrea en infantes y niños menores de cinco años; sin embargo, estos virus originan del 30% al

50% de los episodios de diarrea severa. En dicho país está estimado que los rotavirus son responsables de más de 3 millones de episodios de diarrea, 500,000 visitas al médico, 65,000 hospitalizaciones en promedio y de 20 a 40 muertes anualmente (Fischer *et al.*, 2004).

Estudios realizados en países desarrollados han arrojado que las infecciones por rotavirus tienen un patrón estacional, con picos epidémicos ocurriendo durante los meses más fríos del año (Parashar *et al.*, 1998). En los países en desarrollo los rotavirus han sido documentados como la causa principal de diarrea aguda. Estudios hechos en Asia, África y Latinoamérica indican que del 25% al 55% de las hospitalizaciones debidas a gastroenteritis en niños menores de cinco años están ligadas a infecciones por rotavirus, con más del 80% de las muertes ocurriendo en países de pocos recursos económicos como el sur de Asia y de África. Los países con el mayor número de muertes por año son la India con más de 100,000, China con más de 30,000 y Pakistán con más de 25,000 (Bressee *et al.*, 2005; Guerrant *et al.*, 1983).

b) Morbilidad y mortalidad en México

Según la Organización Mundial de la Salud, en México 5% de las muertes que ocurren en niños menores a cinco años son causadas por diarrea (OMS, 2000). Según estimaciones del año 2006 en México mueren aproximadamente 1000 niños cada año debido a infecciones causadas por rotavirus (Parashar *et al.*, 2006). En un estudio realizado en el 2000 en Yucatán, se encontró que la mayoría de los casos de infecciones por rotavirus ocurrieron entre Enero y Abril. El 50% de los pacientes que presentaron diarrea aguda resultaron ser positivos en la infección por rotavirus. La mayor tasa de incidencia se observó en infantes de seis a ocho meses de edad (Rodríguez-Angulo *et al.*, 2002).

2. Generalidades de Rotavirus

a) Clasificación

Los rotavirus, miembros de la familia *Reoviridae*, se clasifican serológicamente. Un serogrupo incluye aquellos virus que comparten los mismos antígenos; existen siete diferentes grupos de rotavirus. Los rotavirus de los grupos A, B y C se encuentran tanto en humanos como en animales, mientras que los pertenecientes a los grupos D, E, F y G sólo han sido encontrados en animales (Estes y Kapikian, 2006). Los virus dentro de cada grupo son capaces de llevar a cabo rearrreglos genéticos, sin embargo, esto no ocurre entre virus de diferentes grupos (Yolken *et al.*, 1988). Los rotavirus del grupo A se han identificado como los principales agentes causales de diarrea en infantes y en mamíferos y aves jóvenes (Estes y Kapikian, 2006).

Dentro de cada grupo, los rotavirus se clasifican en serotipos definidos por la reactividad de los virus en ensayos de neutralización, también llamados ensayos de reducción de la formación de placas. Es así como se han identificado quince serotipos para VP7 (serotipos G por glicoproteína) y cuatro serotipos para VP4 (serotipos P por proteína sensible a proteasa). Se ha reportado que cepas de origen animal y humano pueden pertenecer al mismo serotipo (Estes y Kapikian, 2006).

b) Estructura y organización del genoma

El genoma viral consiste de once segmentos de RNA de cadena doble (RNAcd) y está contenido en el núcleo del virión. Los once segmentos codifican seis proteínas estructurales (VP, por sus siglas en inglés) las cuales forman la partícula viral, y seis proteínas no estructurales (NSP, por sus siglas en inglés); éstas últimas sólo se encuentran en células infectadas. Los RNAcd libres de la cápside proteica no son infecciosos, lo cual implica que las partículas virales contienen su propia RNA polimerasa para transcribir los segmentos de RNA individuales en RNA mensajero (RNAm) activo (Estes y Kapikian, 2006). El empaquetamiento de estos segmentos de RNA en la cápside requiere de interacciones RNA-proteína; no se conoce cuales son las proteínas responsables del empaquetamiento pero aquéllas que forman el núcleo del

virión: VP1, VP2 y VP3 son ciertamente candidatas, aunque proteínas no estructurales también podrían estar participando (Kapahnke *et al.*, 1986; Estes y Kapikian, 2006; Figura 2).

Actualmente se conoce la secuencia nucleotídica de los once segmentos de RNA de varias cepas de rotavirus. Cada hebra positiva de RNA comienza con un 5'cap ($m^7GpppG^{(m)}G$) y presenta la secuencia consenso 5'-GGC(A/U)7 (Chizhikov y Patton, 2000). Posteriormente se encuentra un marco abierto de lectura que codifica el producto polipeptídico y que termina con un codón de paro. Por último, se encuentra en el extremo 3' una región no codificante con ciertas secuencias conservadas. Dicho extremo termina con la secuencia consenso UGUGACC-3'. Esta última contiene señales importantes para la expresión génica y para la replicación del genoma, por ejemplo, se ha propuesto que los últimos cuatro nucleótidos de los RNA mensajeros podrían funcionar como 'enhancers' de la traducción (Chizhikov y Patton, 2000; Figura 3).

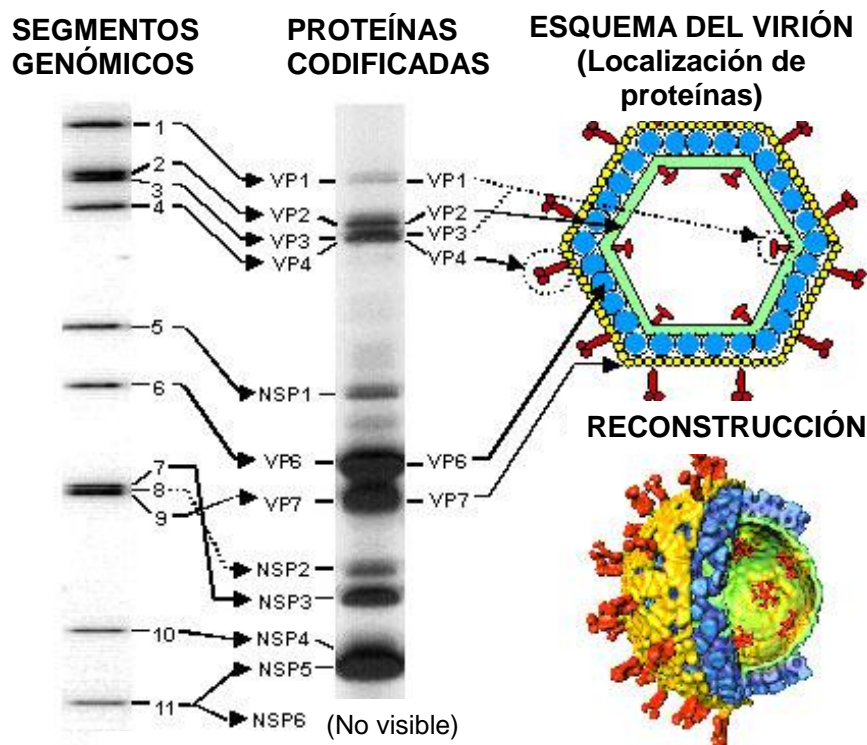


Figura 2. Genoma de rotavirus, proteínas que codifica e imagen reconstruida del virión. A la izquierda se muestra el patrón electroforético de los once segmentos de RNAcd y las proteínas que codifican. A la derecha se muestra la imagen del virus en la que se ilustran las tres capas proteicas y las proteínas virales que las componen (Tomado de Prasad *et al.*, 1988).

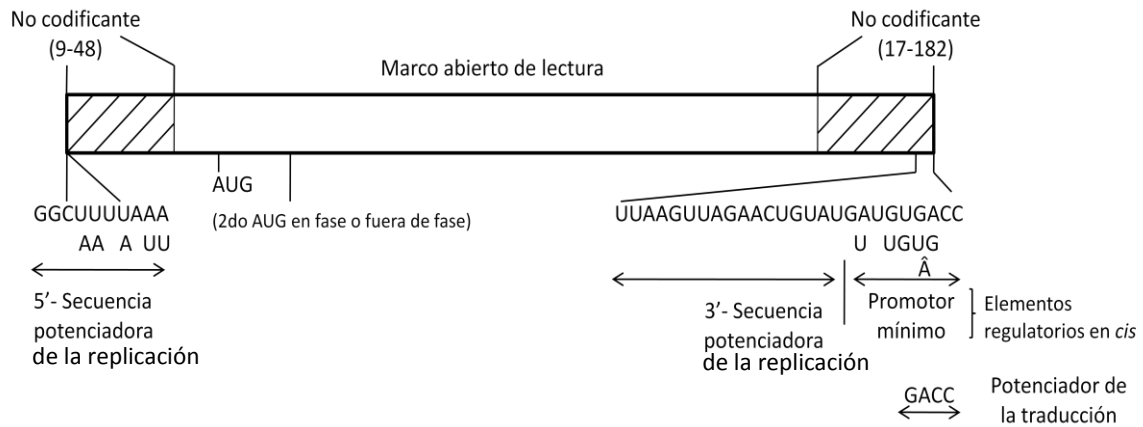


Figura 3. Principales características de la estructura de los genes de rotavirus. Todos los genes de rotavirus carecen de una señal de poliadenilación, son ricos en A + U y contienen secuencias consenso conservadas en sus extremos 5' y 3'. Se muestran las variaciones en sus extremos conservados así como los elementos regulatorios en *cis* requeridos para la replicación de transcritos en ensayos de replicación en sistemas libres de células (Tomado de Estes, 1997).

No existe una señal de poliadenilación en la región 3' terminal de estos genes (Estes y Kapikian, 2006). Todos los genes son monocistrónicos, con la excepción del gen 11 el cual codifica la proteína NSP5 y, en algunas cepas, presenta un segundo marco abierto de lectura río abajo de éste, que codifica la proteína NSP6 (Mattion *et al.*, 1991).

Los genes de rotavirus son ricos en A + U (58%-67%). Los segmentos de RNAd se aparean de extremo a extremo (Imai *et al.*, 1983). Los once RNAm deben tener señales comunes en *cis* debido a que son replicados por la misma polimerasa. Se ha observado que la secuencia UGUG es reconocida de manera específica por la RNA polimerasa (Lu *et al.*, 2006). Además, cada RNAm también debe contener una señal única, ya que los once RNAm deben ser distinguidos uno del otro durante el empaquetamiento. El hecho de que las regiones 5' y 3' no codificantes difieran entre segmentos genómicos podría reflejar señales únicas para el empaquetamiento que distingue a los segmentos durante la replicación. Generalmente, las secuencias terminales conservadas en los segmentos genómicos contienen señales en *cis* que son importantes para la transcripción, traducción, transporte de RNA, replicación, ensamblaje o encapsidación de los segmentos genómicos virales. Algunas de las señales en *cis* para la replicación y la traducción han sido identificadas, pero las señales para el ensamblaje o la encapsidación aún son desconocidas (Patton y Spencer, 2000).

El patrón electroforético del genoma de rotavirus del grupo A está compuesto de cuatro segmentos de RNAd de alto peso molecular (1 al 4), dos segmentos de tamaño medio (5 y 6), un triplete de segmentos distintivo (7 al 9) y dos segmentos pequeños (10 y 11; Tanaka *et al.*, 1988; Figura 4).

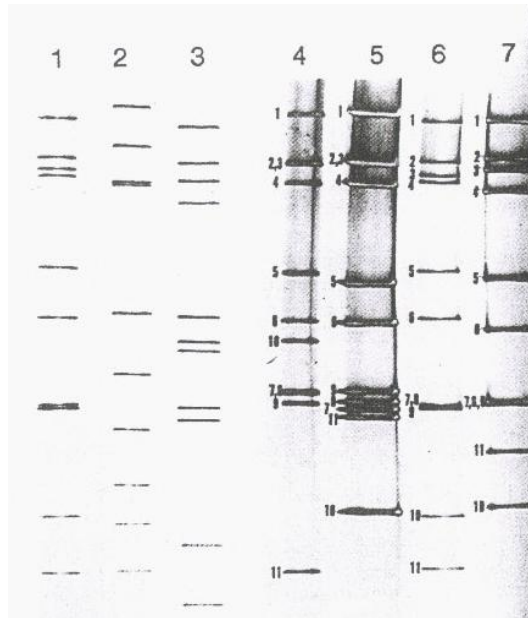


Figura 4. Patrón electroforético de los segmentos de RNA de rotavirus. Los segmentos fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y visualizados por tinción con nitrato de plata. Se muestran los patrones de RNA de rotavirus del grupo A (SA11, carril 1), grupo B (aislado de heces de un adulto con gastroenteritis en China, carril 2) y del grupo C (carril 3). Asimismo se muestran los patrones de rearrreglos de RNA de tres rotavirus de conejo pertenecientes al grupo A (C11, carril 4; Ala, carril 5; y R2, carril 7) y sus segmentos homólogos son comparados con aquéllos de SA11 (carril 6; Tomado de Tanaka *et al.*, 1988).

Cuando no se llega a observar este patrón básico, podría deberse a que el rotavirus que está siendo analizado sea aviar, pertenezca a un grupo diferente al A, o sea un rotavirus del grupo A con rearrreglos en los segmentos genómicos. Los rotavirus que contienen rearrreglos genómicos generalmente no son defectuosos y los segmentos rearrreglados pueden reemplazar a los segmentos normales de RNA tanto estructural como funcionalmente (Estes y Kapikian, 2006).

c) Estructura del virión

Los viriones de rotavirus tienen un diámetro de 70 nm y están conformados por tres capas concéntricas de proteínas. La morfología del rotavirus es distintiva, la partícula

completa asemeja a una rueda con espigas cortas y un rin exterior liso y bien definido; es debido a esto que se le acuñó el nombre de rotavirus (del Latín *rota* que significa rueda; Flewett *et al.*, 1974; Figura 5).

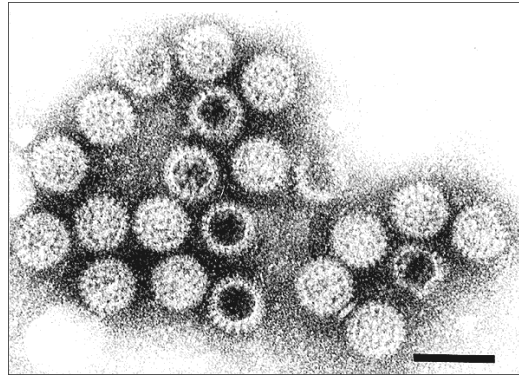
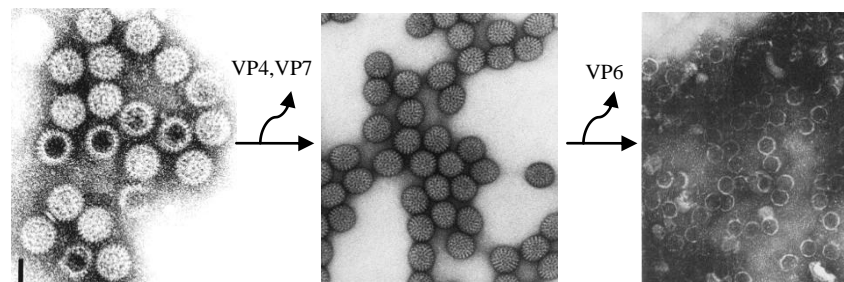


Figura 5. Microscopía electrónica de partículas de rotavirus. Las partículas se obtuvieron a partir de un filtrado de heces de niños con gastroenteritis severa. Barra = 100 nm (Tomada de Kapikian *et al.*, 1974).

Por microscopía electrónica se han podido observar tres tipos de partículas. La partícula infecciosa completa o virión es también llamada partícula de triple capa (TLPs, por sus siglas en inglés). Las partículas de doble capa (DLPs) carecen de la capa más externa. Las partículas de una sola capa (SLPs) son poco frecuentes; generalmente carecen de RNA genómico y forman agregados (Estes y Kapikian, 2006; Figura 6). En la Tabla 1 se encuentran resumidas las características generales de rotavirus.

El virión posee una simetría icosaédrica T=13I (levo). Una característica importante es la presencia de 132 canales grandes atravesando las dos capas exteriores, los cuales unen la superficie externa con el núcleo central o “core”. Basándose en su posición y su tamaño, se han distinguido tres tipos de canales. Doce canales tipo I corren bajo el eje de simetría cinco, 60 canales tipo II se encuentran rodeando al eje de simetría cinco y 60 canales tipo III se encuentran alrededor del eje de simetría tres. Los canales tipo I son los de menor apertura (aproximadamente 40 Å) en la superficie externa del virus. Los canales que se encuentran en el eje de simetría cinco son conductos para la exportación del RNAm y otros canales podrían servir para el importe de metabolitos requeridos para la síntesis de RNA (Prasad *et al.*, 1996).



Partícula:	De triple capa (TLP)	De doble capa (DLP)	De una sola capa o "core" (SLP)
Proteínas:	VP1,2,3,4,6,7	VP1,2,3,6	VP1,2,3
Propiedades biológicas:	Infecciosa Polimerasa inactiva	No infecciosa Polimerasa activa	No infecciosa Polimerasa inactiva

Figura 6. Propiedades biológicas y estructurales de rotavirus. Las micrografías electrónicas muestran partículas de triple capa (TLPs), doble capa (DLPs) y de una sola capa (SLPs) teñidas con 1% de molibdato de amonio. Barra = 100 nm (Modificado de Estes, 1997).

Estructura

- Partículas icosaédricas de 70 nm (100 nm incluyendo las espigas de VP4)
- Cápside proteica de tres capas
- No están envueltos en capa lipídica (resistentes a solventes de lípidos)
- La cápside contiene todas las enzimas necesarias para la producción de RNAm

Genoma

- 11 segmentos de RNAd
- Segmentos de RNAd purificados no son infecciosos
- Cada segmento de RNA codifica al menos una proteína
- Los segmentos de RNA de virus diferentes pero pertenecientes al mismo grupo se recombinan a altas frecuencias durante infecciones duales de células

Replicación

- Ocurre en el citoplasma
- Se forman cuerpos de inclusión
- El crecimiento en cultivo celular se ve facilitado por proteasas
- La replicación del genoma es conservativa
- La morfogénesis involucra partículas envueltas transitoriamente
- Los niveles de calcio intracelular son importantes para el ensamble y estabilidad del virus maduro
- Las partículas virales son liberadas por lisis celular o por transporte vesicular no clásico en células epiteliales polarizadas

Tabla 1. Características generales de rotavirus (Tomada de Estes y Kapikian, 2006).

d) Viroplasmias

El ensamble de los virus generalmente tiene lugar en compartimentos subcelulares específicos dentro de las células infectadas. En los virus pertenecientes a la familia *Reoviridae*, la replicación del RNA, el empaquetamiento del genoma, así como los pasos iniciales del ensamblaje de las partículas virales de doble capa ocurren en inclusiones citoplásmicas de fase densa a las cuales se les ha denominado “fábricas virales” o “viroplasmias” (Estes, 2001; Petrie *et al.*, 1982).

Los viroplasmias de rotavirus fueron visualizados por primera vez como estructuras perinucleares, esféricas y electrodensas en 1980 mediante técnicas de microscopía electrónica (Altenburg *et al.*, 1980; Figura 8). Son estructuras que no se unen a membrana, aparecen a las 2-3 horas post-infección (h PI) y sus constituyentes principales son las proteínas NSP2 y NSP5, aunque otras proteínas virales como VP1, VP2, VP3 y VP6 también se localizan ahí (Petrie *et al.*, 1982; Petrie *et al.*, 1984).

e) Proteínas virales

De las doce proteínas de rotavirus, siete son capaces de interactuar con RNA (VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, NSP3 y NSP5; Estes, 2001).

i. Proteínas estructurales

VP1. La proteína VP1 está codificada por el segmento 1 del genoma de rotavirus y tiene un peso molecular de 125 kDa en los miembros del grupo A y C. Se localiza en el núcleo del virión y su secuencia está muy conservada (Mattion *et al.*, 1994). VP1, junto con VP2 y VP3, actúan formando el complejo de RNA polimerasa y todas las secuencias de VP1 comparten cuatro motivos comunes conservados en todas las polimerasas (Poch *et al.*, 1989). VP1 reconoce al RNA viral en forma específica de secuencia y en conjunto con VP2 y VP3, forman el complejo enzimático con actividad de transcriptasa. Experimentos sugieren que VP1 requiere de VP2 para su actividad de replicasa (Wentz *et al.*, 1996).

VP2. La proteína VP2, codificada por el segmento genómico 2, es el principal componente de la capa interna o “core”, la cual contiene 120 moléculas de esta proteína.

Tiene un peso molecular de 103 kDa y existe similitud en la secuencia de aminoácidos de VP2 de rotavirus del grupo A y C. Se ha observado que VP2 es capaz de miristilarse (Clark y Desselberger, 1988). La miristilación es la adición post-traducciona de un ácido graso (ácido mirístico) a una glicina amino terminal mediante un enlace amida, la enzima que realiza esto es la N-miristil transferasa. Proteínas miristiladas pueden asociarse a membrana celular o a membranas intracelulares, aunque también se ha observado una distribución libre en el citosol (Zurzolo y Rodríguez-Boulan, 1994). La proteína VP2 es rica en prolina y estos residuos de prolina están conservados. Al mismo tiempo existen otros motivos muy conservados de esta proteína: heptarepeticiones de lisina y glutamato, una α -hélice cargada, un motivo hélice-giro-hélice (HTH), una región básica de aproximadamente 50 aminoácidos y dos heptarepeticiones de leucina o cierres de leucina (Mattion *et al.*, 1994). Además contiene un dominio de unión a RNA y otro de unión a VP1, ambos en el extremo amino terminal y que comprenden a los motivos anteriores (Labbé *et al.*, 1991 y Zeng *et al.*, 1998; Figura 7). VP2 también es capaz de unirse a NSP5, aunque este dominio de unión no ha sido bien caracterizado (Berois *et al.*, 2003).

La proteína VP2 presenta afinidad inespecífica por RNA de cadena doble y RNA de cadena sencilla (RNAs), siendo mayor la afinidad por RNAs (Boyle y Holmes, 1986). La expresión de VP2 en un sistema de baculovirus ha demostrado que esta proteína se autoensambla formando partículas “core-like” de 45 nm de diámetro, las cuales están desprovistas de ácidos nucleicos, por lo que este ensamblaje no depende de otras proteínas virales ni de RNAs (Labbé *et al.*, 1991). Asimismo en estudios recientes se logró expresar a la proteína VP2 recombinante en células de mamífero, obteniendo resultados similares: partículas “core-like” de 30 nm de diámetro (Pourasgari *et al.*, 2007).

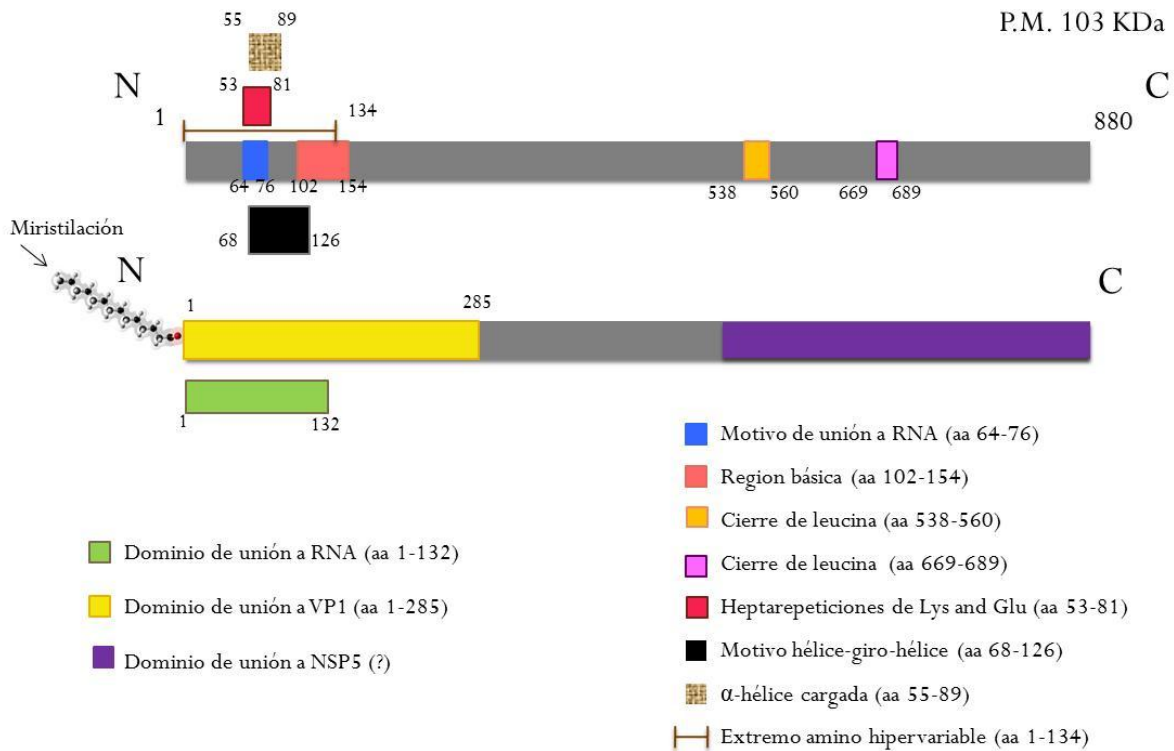


Figura 7. Dominios estructurales y funcionales de la proteína VP2. Arriba se muestran los motivos estructurales presentes en dicha proteína. Abajo se muestran los dominios de unión a RNA y a VP1. El dominio de unión a NSP5 (?) no ha sido bien caracterizado pero se ha determinado que no está presente en el extremo amino terminal de VP2 (Berois *et al.*, 2003) La proteína VP2 sufre la adición de ácido mirístico (Modificado de Mattion *et al.*, 1994).

Como ya se mencionó, la proteína VP2 es capaz de unirse tanto a proteínas estructurales como no estructurales. Utilizando un sistema de replicación *in vitro* se encontró que la actividad enzimática como replicasa de VP1 depende de VP2, ya que sólo se requiere la presencia de las proteínas VP1 y VP2 recombinantes purificadas para obtener el complejo mínimo de replicación (Wentz *et al.*, 1996). Aunado a esto, datos recientes de ensayos de replicación *in vitro* en donde utilizaron proteínas VP2 recombinantes purificadas con una mutación que las vuelve incapaces de formar intermediarios virales core, sugieren que la replicación requiere tanto de la unión de VP2 al RNAm como de la oligomerización de dicha proteína, por lo que se ha propuesto que VP2 funcionaría como una plataforma estructural en donde la cadena molde de RNAm es anclado durante su replicación al RNAd (McDonald y Patton, resultados no publicados).

Recientemente se ha observado que el silenciamiento de VP2 origina una disminución en la tasa de replicación viral, así como en la transcripción y la traducción;

asimismo, se vio afectada la estabilidad de los transcritos virales al disminuir su vida media, por lo que concluyeron que la proteína VP2 favorece la estabilidad de los mensajeros virales, aunque se desconoce si este efecto es directo o indirecto. En conjunto estos resultados podrían implicar que VP2 funcionaría también como un regulador de la eficiencia de la traducción de proteínas virales (Ayala-Bretón *et al.*, 2009).

Se observó por microscopía electrónica que en células infectadas por rotavirus la proteína VP2 se acumula en los viroplasmos (Petrie *et al.*, 1982; Figura 8). En estudios posteriores, se observó por inmunofluorescencia que la proteína VP2 recombinante al ser expresada en células de insecto forma inclusiones citoplásmicas pequeñas, pero la coexpresión de VP2 con NSP5 recombinante modifica la distribución original de VP2 la cual se encuentra ahora localizada en grandes inclusiones citoplásmicas que contienen tanto a VP2 como a NSP5 y que asemejan a viroplasmos (Berois *et al.*, 2003). No obstante, se han obtenido diferentes resultados con respecto a la localización de VP2 en viroplasmos, ya que en ensayos de inmunofluorescencia de células MA-104 infectadas por rotavirus YM a un solo tiempo post-infección (6 h PI) se observaron patrones diferentes de localización para las proteínas VP2 y NSP2 (González *et al.*, 2000; Figura 9).

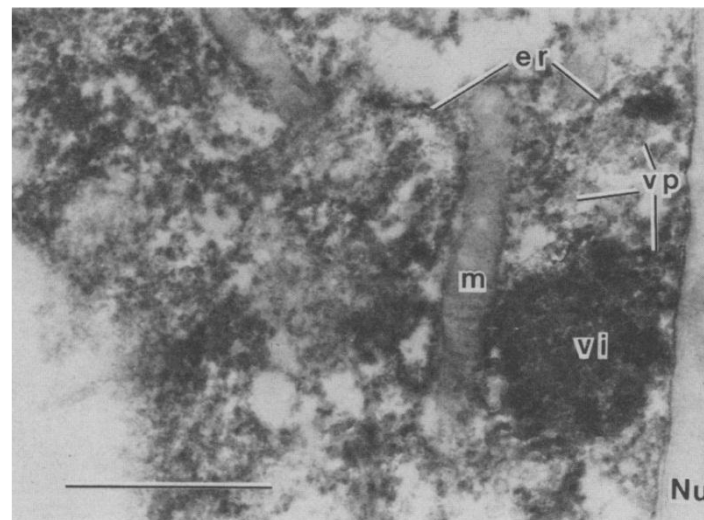


Figura 8. VP2 se ubica en los viroplasmos. Microscopía electrónica de una célula MA-104 infectada por rotavirus SA11 y visualizada con suero anti-VP2 y el complejo de peroxidasa/antiperoxidasa (PAP). Se realizó una segunda fijación con glutaraldehído, una reacción enzimática con diaminobencidina y finalmente una post-fijación con osmio. Se observan muy teñidas las inclusiones viroplásmicas, así como el RE y algunas partículas virales. Abreviaturas: er, retículo endoplásmico; vp, partícula viral; vi, viroplasma; m, mitocondria; Nu, núcleo. Barra = 1 μ m. (Tomada de Petrie *et al.*, 1982).

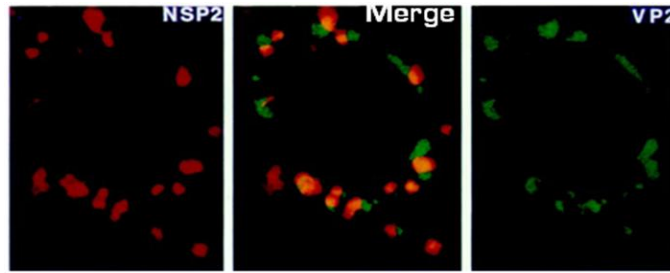


Figura 9. Distribución diferencial de VP2 y de NSP2. Célula MA-104 infectada por rotavirus YM y visualizada con anti-VP2 y anti-NSP2 por inmunofluorescencia confocal. Se observa una localización diferencial de ambas proteínas (Tomada de González *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que NSP5 coimmunoprecipita con VP2 a partir de lisados de células infectadas por rotavirus. La interacción se confirmó al coexpresar dichas proteínas en células de insecto, asimismo, se observó, mediante mutaciones de esta proteína que el extremo amino de VP2 no es necesario para lograr la interacción con NSP5 (Berois *et al.*, 2003).

VP3. Es codificada por el segmento genómico 3 y tiene un peso molecular de 98 kDa (Mattion *et al.*, 1994), presenta actividad de guanilil-transferasa y de metil-transferasa y se encarga de adicionar el 5'cap a los RNA mensajeros. La proteína VP3, junto con VP1 y VP2 se encuentra en la capa más interna del virión. En conjunto, estas tres proteínas envuelven a los once segmentos de RNAcd genómico.

VP4. Es una proteína de la capa externa, no glicosilada, la cual está codificada en el segmento 4 del genoma y tiene un peso molecular 86 kDa. Esta proteína forma las 60 espigas que protruyen de la superficie externa del virión. VP4 ha sido implicada en varias funciones importantes como la penetración celular, hemaglutinación, neutralización y virulencia (Mattion *et al.*, 1994).

VP6. La proteína VP6 es codificada por el segmento 6 del genoma, es una proteína hidrofóbica de 44 kDa, y es susceptible a ser miristilada a pesar de la ausencia de secuencias amino terminal asociadas con la N-miristilación (Clark y Desselberger, 1988). La capa intermedia del virión está compuesta únicamente por 260 trímeros de VP6 (Prasad *et al.*, 1988).

VP7. Es la proteína más abundante de la capa externa formando la superficie lisa del virión maduro. Es una glicoproteína codificada en el segmento 9 del genoma y tiene un peso molecular de 33 kDa (Mattion *et al.*, 1994). La capa externa del virión consiste

de 780 moléculas de VP7 arregladas en trímeros alrededor de los 132 canales acuosos (Prasad *et al.*, 1988).

VP5* y VP8*. Estas proteínas se generan a partir de un precursor mayor, VP4 y se indican con un asterisco (Espejo *et al.*, 1981). Se ha observado que VP8* es la hemaglutinina de varios virus del grupo A (Fiore *et al.*, 1991). Se ha propuesto que éstas, junto con VP7 se encargan de lisar a la membrana endosomal una vez que el virión ha sido internalizado, para lograr su liberación al citosol (Ludert *et al.*, 1987; Cohen *et al.*, 1979, Ruiz *et al.*, 2000).

ii. Proteínas no estructurales

NSP1. Es una proteína de 58 kDa codificada en el segmento 5 del genoma de rotavirus del grupo A. Es la proteína menos conservada aunque presenta un motivo de dedo de zinc muy conservado (Mattion *et al.*, 1994).

NSP2. Es una proteína básica, muy conservada dentro de los rotavirus del grupo A en los cuales está codificada por el segmento 8 del genoma (Mattion *et al.*, 1994). Tiene un peso molecular de 36 kDa y se encuentra formando un octámero con forma de dona la cual representa interacciones cola-cola de dos tetrámeros (Jayaram *et al.*, 2002). Se ha observado que NSP2 es el constituyente principal de los viroplasmos (Petrie *et al.*, 1984; Figura 10). En células infectadas por rotavirus, se observó que NSP2 inmunoprecipita con NSP5 (Afrikanova *et al.*, 1988). Asimismo, se ha encontrado a dicha proteína en partículas subvirales con actividad de replicasa (Gallegos y Patton, 1989). Experimentos de entrecruzamiento han establecido que NSP2 forma complejos con VP1 y posiblemente con VP3 *in vivo* (Kattoura *et al.*, 1994). En células infectadas, NSP2 puede encontrarse fosforilada, y es capaz de unirse a RNA de forma cooperativa. La afinidad por RNAs es mayor que por RNAsd (Taraporewala *et al.*, 1999). Esta proteína se une a los 11 segmentos del genoma de rotavirus en células infectadas (Aponte *et al.*, 1996). Asimismo, se ha observado que NSP2 tiene actividad de trifosfatasa de nucleósido dependiente de Mg^{2+} , así como actividad desestabilizadora de hélice sin polaridad, para la cual no requiere de cationes divalentes ni de fuente de energía nucleotídica. En el ambiente celular, ambas actividades podrían estar asociadas (Taraporewala *et al.*, 1999; Taraporewala y Patton, 2001). Recientemente se determinó que NSP2 también presenta actividad de cinasa de nucleótidos difosfato (NDP; Kumar

et al., 2007). Debido a su actividad de nucleósido trifosfatasa (NTPasa), se ha propuesto que esta proteína cumple un papel en el empaquetamiento y replicación del RNA del virus, posiblemente al actuar como un motor molecular que coordina el empaquetamiento del RNA viral con el ensamble del virión (Taraporewala *et al.*, 1999). Recientemente se ha observado que NSP2 también presenta actividad de trifosfatasa de RNA, por lo que es capaz de acomodar nucleótidos trifosfato (NTPs) y RNAs en su sitio catalítico durante la hidrólisis del fosfato γ (Vasquez-Del Carpio *et al.*, 2006). Utilizando el sistema de replicación *in vitro* de “open-cores”, se observó que NSP2 inhibe la síntesis de la hebra (-) de RNA en una forma dependiente de concentración, al estar interfiriendo con la función de VP2. Los resultados sugieren que la inhibición es mediada por la unión inespecífica de NSP2 al RNA (Vende *et al.*, 2003).

NSP3. Esta proteína no estructural es producida en grandes cantidades por el virus. Tiene un peso molecular de 34 kDa y es codificada por el segmento 7 del genoma de rotavirus del grupo A (Mattion *et al.*, 1994). En células infectadas NSP3 se observa distribuida en una red de filamentos a lo largo del citoplasma (Mattion *et al.*, 1992).

NSP4. Es una glicoproteína transmembranal codificada por el gen 10 de rotavirus del grupo A. El producto primario tiene un peso molecular de 20 kDa, sin embargo, después de ser glicosilado en el extremo amino terminal da lugar a una proteína madura de 28 kDa (Mattion *et al.*, 1994).

NSP5. Es el producto mayor del segmento 11 del genoma de rotavirus. Es una proteína muy bien conservada dentro del grupo A que se encuentra en forma de dímeros (Mattion *et al.*, 1994). Por ensayos de entrecruzamiento se ha observado que NSP5 se une a VP1 y a NSP2 (Afrikanova *et al.*, 1998). NSP5 es una cinasa que fosforila residuos de serina, asimismo, tiene actividad de adenosil trifosfatasa (ATPasa) dependiente de Mg^{2+} . La proteína sufre ciertas modificaciones post-traduccionales como fosforilación y O-glicosilación (Blackhall *et al.*, 1997; Welch *et al.*, 1989; González y Burrone, 1991; Bar-Magen *et al.*, 2007).

La inhibición de la expresión de NSP5 afecta la transcripción y la replicación viral. Asimismo, se observa una reducción en el número y tamaño de los viroplasmos, se altera la distribución de otras proteínas asociadas a éstos y por lo tanto, se ve inhibida la formación de partículas infecciosas (Campagna *et al.*, 2005; López *et al.*, 2005).

Aunado a esto, se observó por inmunofluorescencia que la coexpresión de dichas proteínas, en un sistema del virus vaccinia, da lugar a la formación de estructuras

semejantes a viroplasmos (VLSs; Fabbretti *et al.*, 1999). Los VLSs reciben este nombre por su semejanza morfológica con los viroplasmos de células infectadas por rotavirus. A pesar de que los VLSs carecen de RNA viral y de otras proteínas también presentes en viroplasmos, éstas son subestructuras que *bona fide* representan algunas de las propiedades de los viroplasmos como son la asociación con componentes del citoesqueleto y la fusión entre ellos a lo largo del tiempo (Cabral-Romero y Padilla-Noriega, 2006; Eichwald *et al.*, 2004). Se ha observado que el extremo carboxilo terminal de NSP5 se requiere para la formación de los VLSs (Sen *et al.*, 2007). En dichas estructuras se observa que NSP2 se localiza en la parte central mientras que la ubicación de NSP5 es más externa.

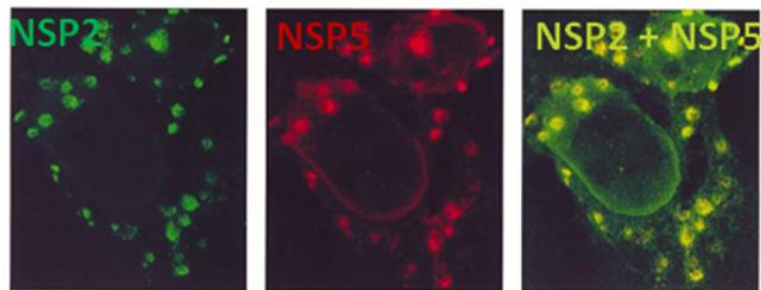


Figura 10. Colocalización de NSP2 y NSP5 en viroplasmos. Células infectadas por rotavirus y visualizada por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-NSP2 y anti-NSP5 (Tomado de Fabbretti *et al.*, 1999).

Finalmente, resultados recientes de Contin *et al.* (2010) sugieren que la proteína NSP5 funciona como un reclutador de varias proteínas virales, entre ellas VP2 por lo que sería la encargada de reclutar a VP2 a los VLSs. Asimismo, ellos encontraron que basta con la coexpresión de VP2 y de NSP5 para la formación de los VLSs (Figura 11).

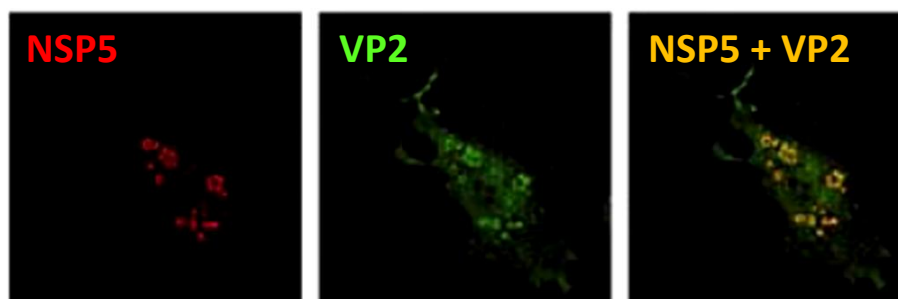


Figura 11. Formación de VLSs a partir de la expresión de VP2 y NSP5. Inmunofluorescencia confocal de célula MA-104 transfectada con VP2 y NSP5. Se utilizaron anticuerpos anti-VP2 y anti-NSP5 para la visualización. Se aprecia la formación de VLSs (Tomado de Contin *et al.*, 2010).

NSP6. Es codificada por el segmento 11 al igual que NSP5, pero como un segundo marco de lectura abierto, río abajo del inicio del marco de lectura de NSP5. El producto polipeptídico es de menor peso molecular: 12 kDa (Mattion *et al.*, 1994). Su función durante la infección viral es desconocida.

3. Estadios de replicación

El tropismo celular natural de rotavirus es el enterocito diferenciado del intestino delgado, particularmente en la región media y superior. Sin embargo, se ha observado que el virus puede propagarse a tejidos extraintestinales, lo cual sugiere que existe un rango más amplio de células hospedero para este virus (Crawford *et al.*, 2006).

La replicación de rotavirus en cultivos de células derivadas del riñón de mono es bastante rápida, con una máxima producción de virus a las 10 ó 12 h PI a 37° C (Clark *et al.*, 1979). La replicación del virus en cultivos de células intestinales humanas (Caco-2) es un poco más lenta, con una máxima producción de éste a las 20 ó 24 h PI (Jourdan *et al.*, 1995).

a) Adsorción, penetración y pérdida de la capa externa

El paso inicial en la infección del virus consiste en la adhesión del virus a la superficie de la célula hospedera. El rotavirus puede unirse a una gran cantidad de células, lo que sugiere que la unión inicial es un evento promiscuo y que la posterior unión a otros receptores es crítica para la entrada del virus a la célula (Estes y Kapikian, 2006). El virus se adhiere a la célula mediante la proteína VP4 o su producto hidrolítico VP5* (Zarate *et al.*, 2000).

La entrada de rotavirus a la célula es al parecer un proceso de varios pasos que requiere tanto a VP4 como a VP7 y que involucra interacciones secuenciales con varios ligandos así como cambios conformacionales de las proteínas de la cápside (Méndez *et al.*, 1999).

Evidencia adicional indica que el tipo de glicoconjugado (gangliósido, glicolípido neutro o glicoproteína) que funciona como un receptor *in vivo* depende de la cepa de rotavirus y del tipo de célula hospedera estudiada (Fukudome *et al.*, 1989). De hecho, los rotavirus que dependen de ácido siálico y los que no lo hacen utilizan diferentes

receptores; aunque estudios realizados en células no polarizadas sugieren que podrían compartir un segundo receptor (Méndez *et al.*, 1999).

La tripsinización de VP4 estimula la penetración viral así como la infectividad. Los productos hidrolíticos de VP4, VP5* y VP8* permanecen asociados al virión (Estes *et al.*, 1981). Algunos estudios han demostrado que VP7 une Ca^{2+} en la ausencia de otras proteínas virales y que el cambio conformacional en VP7 inducido por agentes quelantes de Ca^{2+} como el EGTA y el EDTA podría mediar la pérdida de la capa externa del virión (Dormitzer y Greenberg, 1992).

La unión y entrada de rotavirus a la célula incluye mecanismos tales como la unión en dos diferentes sitios de la membrana celular posiblemente mediante dos diferentes proteínas del virus, así como la penetración directa de los virus unidos en vez de endocitosis convencional mediada por receptor (Figura 12; Estes y Kapikian, 2006).

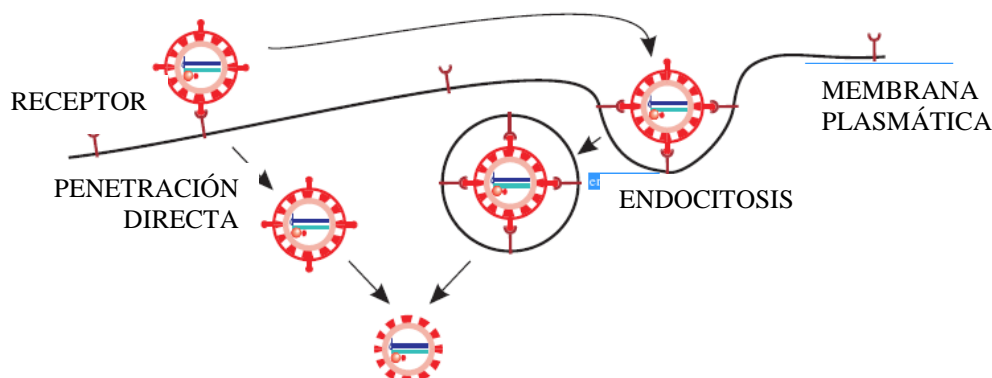


Figura 12. Modelos propuestos para la entrada de rotavirus a la célula. El rotavirus puede entrar por penetración directa de la membrana plasmática o por endocitosis (Tomado de Carter and Saunders, 2007).

Después de unirse, el virus es internalizado en un periodo de 60 a 90 minutos, para lo cual requiere de procesos celulares activos (Keljo y Smith, 1988). Estudios de microscopía sugieren que la entrada de rotavirus SA11 ocurre por endocitosis y que las partículas virales son rápidamente transportadas a lisosomas (Petrie *et al.*, 1981; Figura 13). En la pérdida de la capa externa se ha implicado a VP5*, la cual se ha propuesto como la responsable de participar en la salida de Ca^{2+} del endosoma, la cual se piensa que ocurre mediante canales, difusión o transporte activo. Una vez que las

concentraciones de Ca^{2+} dentro y fuera del endosoma son las mismas, se liberan las proteínas de la capa externa VP5*, VP7 y VP8* las cuales se encargan de lisar a la membrana endosomal dando como resultado la liberación de una partícula de doble capa al citosol que ya es activa transcripcionalmente (Ludert *et al.*, 1987; Cohen *et al.*, 1979, Ruiz *et al.*, 2000).

b) Transcripción, traducción y replicación

La síntesis de los transcritos virales es mediada por un complejo enzimático formado por VP1 y la guanilil y metil-transferasa VP3, dicho complejo se localiza en una estructura con forma de flor adherida al núcleo de VP2 en los ejes de simetría cinco (Cohen, 1977; Lawton *et al.*, 1997). Las partículas de rotavirus contienen las actividades enzimáticas requeridas para la síntesis del mensajero con 5' cap, incluyendo actividad de transcriptasa, nucleótido fosfohidrolasa, guanililtransferasa y metilasa (Spencer y Arias, 1981; Gorziglia y Esparza, 1981).

La transcriptasa se encuentra latente en el virión y puede ser activada *in vitro* mediante tratamiento con un agente quelante o por choque térmico. Esto resulta en la pérdida de la capa externa con la consecuente conversión del virión a una partícula de doble capa (Cohen *et al.*, 1979).

La transcripción es asimétrica y todos los transcritos son hebras positivas sintetizadas a partir de la hebra negativa del RNAd (McCrae y McCorquodale, 1983). La transcripción primaria podría ocurrir antes de la formación de los viroplasmos. Mediante análisis de inmunofluorescencia de RNA marcado con bromouridina se ha observado que la síntesis de hebras positivas ocurre en viroplasmos por lo que éstos se han propuesto como el sitio donde tendría lugar la transcripción secundaria, la cual ocurre entre las 8 y 9 h PI (Silvestri *et al.*, 2004; Figura 13). Análisis de curvas de la cinética de transcripción y replicación viral muestran un patrón muy similar para ambas: un incremento lineal pequeño durante las primeras 4 h PI y un incremento logarítmico en tiempos más tardíos. Esto favorecería la hipótesis de dos rondas de transcripción durante el ciclo replicativo viral. La transcripción ocurre en DLP's estructuralmente intactas y requiere de una forma hidrolizable de adenosil trifosfato (ATP) el cual podría ser utilizado para la iniciación y/o elongación de las moléculas de RNA (Spencer y Arias, 1981). La síntesis de RNA ocurre en el núcleo del virión debido a que aquí se

encuentra el complejo transcripcional compuesto de VP1 y VP3. El RNA recién transcrito sale de ahí mediante canales tipo I presentes en la capa de VP2; múltiples transcritos pueden ser liberados simultáneamente en una partícula activa transcripcionalmente (Lawton *et al.*, 1999).

Las hebras positivas de RNA codifican las proteínas virales y funcionan como moldes para la síntesis de hebras negativas para la producción del RNACd (Estes y Kapikian, 2006). Análisis de la cinética de la síntesis de RNA en células infectadas mostraron que hebras positivas y negativas se detectan a las 3 h PI. A partir de ese momento, el nivel de transcripción aumenta hasta las 9-12 h PI en donde los niveles de hebras positivas de RNA alcanzan el máximo. Varias horas después se observa el máximo nivel de hebras negativas (Stacy-Phipps y Patton, 1987).

La traducción de los mensajeros virales, los cuales presentan 5' cap pero no son poliadenilados, se ve facilitada por la acción de NSP3, la cual funciona análogamente a la proteína celular de unión a poli(A) (PABP). El extremo amino de NSP3 interactúa con una secuencia consenso en el extremo 3' de los mensajeros virales, mientras que el extremo carboxilo interactúa con eIF4G con mayor afinidad que PABP, permitiendo la circularización de los mensajeros virales así como su transporte a los ribosomas (Piron *et al.*, 1998; Groft y Burley, 2002). Esto conduce a estimular la traducción de los mensajeros virales y simultáneamente, a inhibir la traducción de los mensajeros celulares (Padilla-Noriega *et al.*, 2002).

Como se ha mencionado, se ha propuesto que existen dos eventos de transcripción durante la infección viral. La transcripción primaria, la cual ocurriría en bajos niveles, estaría dándose tempranamente en el citosol a partir de partículas virales que recién entraron a la célula. La transcripción secundaria ocurriría tardíamente en los viroplasmos, a niveles mucho más elevados que la primaria y a partir de partículas virales recién sintetizadas. De esta forma, se ha propuesto que una vez que haya tenido lugar la transcripción primaria, las proteínas traducidas a partir de esos transcritos servirían como focos para la formación de los viroplasmos; posteriormente tendría lugar el evento de transcripción secundaria a partir de partículas virales de doble capa recién sintetizadas. Estos transcritos serían retenidos de irse a citosol por proteínas capaces de unir RNA y que se encuentran en los viroplasmos, para ser así utilizados como moldes para la replicación. Cuando la cantidad de transcritos virales excediera a la cantidad de proteínas capaces de retenerlos, éstos saldrían a citosol en donde se llevarían a cabo

rondas de traducción secundaria, las proteínas recién sintetizadas se utilizarían para incrementar el tamaño y el número de los viroplasmos, y por ende las tasas de transcripción y replicación viral (Silvestri *et al.*, 2005).

La replicación de rotavirus ocurre de manera conservativa y ambas hebras parentales permanecen dentro de las partículas virales parcialmente descubiertas. Después de su síntesis, el RNACd permanece asociado a las partículas virales lo cual sugiere que no es posible encontrar RNACd libre en la célula.

Se ha propuesto un modelo de replicación viral que reúne a las proteínas VP1, VP2, VP3, NSP2 y NSP5. Éstas, junto con el RNAm viral, interactúan para formar intermediarios de la replicación “core-like” (core RIs), los cuales catalizan la síntesis de RNACd en los viroplasmos de las células infectadas. En este modelo, la RNA polimerasa VP1, y la enzima guanilil y metil-transferasa VP3, interactúan con el RNAm viral para formar un complejo “pre-core” que carece de actividad de replicasa. Este complejo interactúa con dímeros de VP2, octámeros de NSP2 y dímeros de NSP5, produciendo estructuras con actividad de replicasa que catalizan la síntesis de RNACd. Las propiedades de NSP5 y, particularmente la actividad de NTPasa de NSP2, sugieren que su función es facilitar el empaquetamiento de RNAm viral en “cores” durante la replicación. La interacción de VP6 con los core RIs generaría partículas virales de doble capa (Patton, 2001).

La proteína NSP5, gracias a su habilidad de interactuar con VP2, podría fungir como un adaptador para facilitar las interacciones entre NSP2, VP1 y VP3 durante el ensamblaje del core y la encapsidación del RNA, al modular el papel de NSP2 como motor molecular involucrado en el empaquetamiento de los mensajeros virales. Si los sitios de unión a NSP5 y a RNA de NSP2 se sobrelapan, la función de NSP5 podría ser regular la unión de NSP2 al RNA durante la replicación y el empaquetamiento. A partir de los estudios realizados sobre la interacción entre VP2 y NSP5 se ha propuesto la hipótesis de que NSP5 sería un intermediario entre VP2 y NSP2, modificando así el modelo propuesto por Patton (Berois *et al.*, 2003).

c) Encapsidación del RNA y ensamble del virión

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar el mecanismo selectivo de empaquetamiento que conduce a la presencia de segmentos del genoma equimolares en los rotavirus. El mecanismo propuesto por Patton (2001) ya ha sido explicado en el apartado de replicación. En este modelo el “core” representa una colección de unidades pentaméricas separadas y funcionales, cada unidad contiene su propio complejo enzimático formado por VP1 y VP3, y sería responsable de la transcripción de uno de los segmentos del genoma. El complejo enzimático se asociaría con un RNAm específico atrayendo a VP2 y ensamblándose en pentámeros. Las interacciones RNA-RNA entre los mensajeros de distintas unidades pentaméricas dirigirían el ensamble del “core” icosaédrico. Cambios estructurales en VP2, como consecuencia de la unión de pentámeros podrían activar a la polimerasa estimulando la síntesis de la hebra negativa (Patton y Spencer, 2000).

En los viroplasmos, el RNAm viral es replicado para producir RNAd, el cual es simultáneamente encapsidado en partículas virales de doble capa que contienen a los once segmentos de RNAd, por lo que la replicación viral no es separable de la morfogénesis. La capa más externa se adquiere mediante la gemación de las partículas virales de doble capa a través del retículo endoplásmico (ER), y por lo tanto las partículas en maduración quedan envueltas transitoriamente. Durante la gemación, el extremo carboxilo de NSP4 funciona como un receptor de ER que une a VP6 en las DLPs, así como a VP4, la cual se piensa que se encuentra en el citosol entre los viroplasmos y el ER mediando la gemación. La envoltura lipídica es perdida mientras las partículas se mueven a lo largo del ER; tanto las altas concentraciones de Ca^{2+} en el ER como la proteína VP7 han sido implicadas en dicho fenómeno. Una vez que se pierde esta capa, las proteínas VP4 y VP7 se re-arreglan para formar la cápside externa del virión (Estes, 2001; Ruiz *et al.*, 2000; Figura 13). Los virus producidos en la ausencia de calcio carecen de la capa más externa y no se observa la gemación a través del ER (Shahrabadi *et al.*, 1987). Es posible que el calcio estabilice o module el plegamiento o compartimentalización de VP7 recién glicosilada para su posterior ensamblaje en partículas. El proceso de gemación puede ocurrir en ausencia de calcio, sin embargo, VP7 es retenida en el ER (Ahmadian y Shahrabadi, 1999).

Debido a la ausencia de secuencias señal que manden a las proteínas al ER, se ha concluido que la mayoría de las proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus son sintetizadas en ribosomas libres. En contraste, las glicoproteínas VP7 y NSP4 son sintetizadas en ribosomas asociados a la membrana del ER y son insertadas cotraduccionalmente en la membrana del ER como resultado de secuencias señal en su extremo amino terminal (Ericson *et al.*, 1983).

d) Liberación del virus maduro

El ciclo de infección termina cuando la progenie de virus es liberada por lisis celular en células no polarizadas (Altenburg *et al.*, 1980; Figura 13). Una citólisis extensiva durante la infección tardía, así como alteraciones drásticas en la permeabilidad de la membrana de células infectadas resultan en la liberación de proteínas virales y celulares. A pesar de la lisis celular, la mayoría de las partículas de doble y de triple capa permanecen asociadas a residuos celulares, lo cual sugiere que dichas partículas interactúan con estructuras celulares (Musalem y Espejo, 1985).

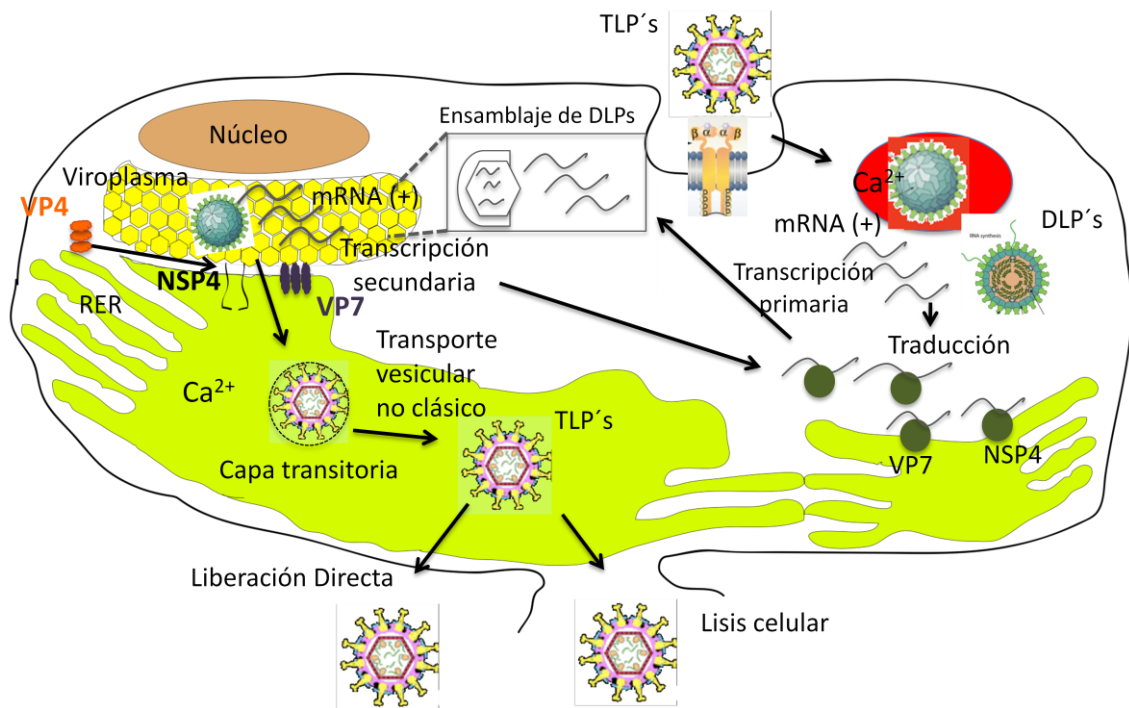


Figura 13. Principales características del ciclo replicativo de rotavirus. El virus entra a la célula, posiblemente por endocitosis mediada por receptor, proceso en el cual se pierde la capa externa del virus y se activa la actividad de transcriptasa. Los RNAm virales pueden ser traducidos o bien servir como cadena molde para la replicación del genoma, proceso que se da en forma simultánea con el ensamble de la partícula viral. La maduración final de la partícula viral se da en el interior del retículo endoplásmico en donde además de adquirir la capa externa, se añade una membrana lipídica transitoria y el virus sale de la célula ya sea por lisis celular o por liberación directa. Abreviaturas: TLP's, partículas de triple capa; DLP's, partículas de doble capa; RER; retículo endoplásmico rugoso.

4. Partículas defectivas interferentes

Durante los ciclos de replicación virales es común que se produzcan virus o partículas defectivas interferentes (DI). Estas partículas DI fueron definidas por primera vez en virus de DNA de la familia Polyomaviridae como virus mutantes generados espontáneamente en donde una porción crítica del genoma viral ha sido eliminada. Al menos un gen esencial del virus se ha eliminado completamente o lo suficiente para volverlo no funcional. El genoma resultante es defectivo en la replicación en ausencia del producto del gen eliminado por lo que requiere de la presencia de otros virus (virus ayudantes). Para poder ser propagados, los virus DI deben retener ciertas señales críticas para la morfogénesis, el empaquetamiento y la replicación del genoma. Los virus DI suprimen la producción de virus ayudantes en células coinfectadas por ambos, fenómeno conocido como interferencia. Los virus DI se producen en infecciones por virus animales, de plantas y de hongos (Perrault, J., 1981).

El mecanismo propuesto para la generación de los genomas de virus DI es el de 'copia y elección'. Errores de la polimerasa viral harían que ésta 'saltara' de un molde a otro o de una parte del molde a otra continuando la elongación en el extremo 3' de la cadena naciente sintetizada previamente al salto. Muchos virus DI son transcripcionalmente inactivos y no codifican ninguna de las proteínas complementarias usuales del virus, las proteínas del virión son provistas por los virus ayudantes, por lo que éstos y los DI son antigénicamente idénticos. En los casos en que el tamaño de la partícula está determinado por la longitud del genoma, los viriones DI pueden ser más pequeños que los ayudantes, y pueden ser separados por procesos biofísicos como la centrifugación en gradiente (Perrault, J., 1981).

Es de notar que la propagación e interferencia de virus DI es homotípica, es decir, que solo interfieren con los virus a partir de los cuales se derivaron originalmente. Los virus DI se generan tradicionalmente por pases a altas multiplicidades de infección. Si el genoma de virus DI es más pequeño que el de los virus ayudantes, entonces su genoma podría ser sintetizado en un tiempo significativamente menor por la polimerasa viral. Eventualmente, la mayor cantidad de genomas DI secuestrarán algún factor limitante, como componentes de la polimerasa o proteínas esenciales del huésped y la replicación de virus ayudantes se verá inhibida (Huang y Baltimore, 1970). Ensayos de replicación

in vitro del virus de la estomatitis vesicular (VSV) de la familia Rhabdoviridae, con genoma de RNA, han demostrado que el RNA DI puede interferir con la síntesis del genoma completo. Asimismo, el factor limitante por el que compiten los virus DI y los ayudantes son las proteínas L y P, componentes de la polimerasa viral (Giachetti y Holland, 1989).

Se han identificado virus DI en infecciones por reovirus, aunque se desconoce el mecanismo por el cual se generan así como los mecanismos de interferencia. Se sabe que 1 de cada 46,000 partículas de rotavirus en heces es infecciosa en células de riñón de mono y que 1 de cada 6,600 partículas de rotavirus es infecciosa en cultivo de estas mismas células, lo cual sugiere que existen infecciones abortivas que podrían estar mediadas por partículas defectivas o, en su caso, por partículas DI sin embargo, hasta la fecha no existen estudios sobre la producción de partículas DI en infecciones por rotavirus (Ward *et al.*, 1984).

5. Mecanismos de neutralización por anticuerpos monoclonales anti-rotavirus.

La capa externa de rotavirus se encuentra formada por las proteínas estructurales VP4 y VP7. Se ha demostrado que ambas proteínas son inumogénicas tanto en condiciones experimentales como durante la infección natural (Shaw *et al.*, 1987 y Svensson *et al.*, 1987). De hecho, se han utilizado anticuerpos contra VP4 y VP7 de manera efectiva para prevenir la replicación del virus en cultivos celulares así como para proteger pasivamente a animales de laboratorio contra infecciones por el virus (Hoshino *et al.*, 1985 y Matsui *et al.*, 1989). Por ensayos de competencia de unión con anticuerpos monoclonales (AMC) neutralizantes, se identificó al menos un dominio de neutralización en VP7 y al menos dos en VP4. Cada uno de éstos contiene varios epítopes (Taniguchi *et al.*, 1984 y Shaw *et al.*, 1986).

En vista de la complejidad estructural y antigénica de rotavirus, es probable que los anticuerpos dirigidos a diferentes sitios de la superficie viral medien la neutralización de la infectividad por una variedad de mecanismos diferentes. Se ha demostrado que AMC neutralizantes dirigidos contra el producto hidrolítico de VP4, es decir, VP8* evitan la unión del virus RRV a células MA-104, neutralizando así la infección (Ruggeri y Greenberg, 1991). Por el contrario, AMC neutralizantes dirigidos contra VP7 no evitan la unión del virus RRV a células MA-104 sino que interfieren con un paso posterior a la adsorción viral. Se observó que el tratamiento con papaína, el cual rompe la molécula del anticuerpo en sus tres fragmentos, de AMC neutralizantes dirigidos contra VP7 (159, 4F8, 5H3) permitió recuperar la infectividad, lo cual sugiere que para lograr la neutralización, dichos anticuerpos se unen divalentemente a la partícula viral. Asimismo, se encontró que la unión de estos anticuerpos a tan sólo 1-10% de su antígeno en el virión es suficiente para lograr un 90% de neutralización. Estos resultados sugieren que dichos anticuerpos, al estar uniéndose dos monómeros de VP7, interfieren con la remoción de la capa externa que se requeriría para que el virus penetrara a la célula. Por lo anterior, se requiere muy poco anticuerpo unido a la proteína VP7 para evitar la remoción de la capa externa, neutralizando así al virus adsorbido a la superficie celular (Ruggeri y Greenberg, 1991).

VI. Justificación

Se sabe que VP2 es una proteína importante para la replicación del genoma de rotavirus, sin embargo se conoce poco acerca de otras posibles funciones de esta proteína durante el ciclo replicativo y en la regulación de la expresión viral. También se ha reportado que VP2 se localiza en viroplasmos como fuera de ellos. Sin embargo, no existe un estudio de la cinética de la distribución de la proteína VP2 a lo largo de la infección por rotavirus y los estudios realizados a un solo tiempo post-infección no permiten apreciar la dinámica de la localización de dicha proteína. Por lo tanto es importante determinar la ubicación de la proteína VP2 a distintos tiempos post-infección. Un estudio de este tipo permitirá aportar indicios acerca de qué otras funciones tiene la proteína VP2 durante la infección viral.

Por otro lado, se ha demostrado que NSP5 es capaz de interactuar con VP2, lo que podría tener implicaciones en la secuencia de eventos para la formación del complejo de replicasa en el modelo propuesto por Patton (2001).

Por lo anterior, estamos interesados en investigar la serie de interacciones propuestas en el modelo de replicación de rotavirus, en particular, si VP2 es reclutada hacia VLSs por los componentes elementales de dichas estructuras: NSP2 y NSP5.

VII. Objetivos

Objetivo General

Determinar la distribución intracelular de la proteína VP2 de rotavirus durante el proceso de infección, así como el efecto de las proteínas virales NSP2 y NSP5 sobre su localización.

Objetivos Específicos

1. Determinar la distribución intracelular de la proteína VP2 en células infectadas por rotavirus a diferentes tiempos post-infección.
2. Determinar la distribución intracelular de la proteína VP2 expresada en un sistema del virus vaccinia.
3. Determinar la distribución intracelular de la proteína VP2 cuando se coexpresa, en un sistema híbrido del virus vaccinia, con NSP2 y NSP5.

VIII. Hipótesis

En células infectadas por rotavirus, VP2 se distribuirá tanto en viroplasmos como fuera de éstos.

IX. Metodología General

1) Cultivo de células de mamífero

Para los estudios realizados durante el desarrollo de este proyecto se utilizaron células epiteliales de riñón de mono *Cercopithecus aethiops* MA-104 y BS-C-1 (ATCC). Las células se mantienen en cultivo a 37 °C y 5% de CO₂ utilizando frascos de fondo plano en donde crecen formando una monocapa. El protocolo para subcultivar estas células es el siguiente: se remueve el medio MEM-10 (*Minimum Eagle's Medium* más 3% de NaHCO₃, 1% de Glutamax, 1% de penicilina-estreptomicina y 10% de suero fetal bovino) del frasco y se enjuaga dos veces con buffer Verseno-EDTA. Se enjuaga una vez con Tripsina-EDTA y se dejan de 1-2 ml de Tripsina-EDTA durante 5-10 min incubando a 37 °C, 5% de CO₂. Finalmente, se agrega medio MEM-10 fresco y se descarta cierta cantidad de este de tal manera que sólo queden en el frasco la cantidad de células que uno requiera. Se afora con 15 ó 30 ml de MEM-10 dependiendo del tamaño del frasco (F75 o F162, donde el número indica los cm² de superficie).

2) Inmunofluorescencia de células MA-104 y BS-C-1 infectadas por rotavirus SA11 a un solo tiempo post-infección.

Para analizar la distribución intracelular de la proteína VP2 de rotavirus a un solo tiempo post-infección (t PI), se sembraron 6×10^4 células MA-104 y BS-C-1 por ml en medio MEM con 10% de suero fetal bovino (MEM-10) en una laminilla de 16 pozos (3.2×10^4 células por pozo en 200 μ L de MEM-10) y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ hasta que alcanzaran confluencia, lo cual normalmente ocurre a los 4 días después de la siembra.

Se infectaron la células con rotavirus cepa SA11 (amablemente donada por el laboratorio de la Dra. Mary K. Estes, Baylor College of Medicine, Texas) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.8 unidades formadoras de foco por célula (UFF/cél). Para esto se activaron 100 μ L de rotavirus con 0.5 μ L de tripsina (2 mg/ml, concentración final 10 μ g/ml) a 37 °C durante 30 minutos. Se lavaron las células con medio MEM sin suero (MEM-SS) y se añadieron 50 μ L de virus activado y diluido a la

MOI deseada a cada pozo. A una h PI se retiró el inóculo lavando dos veces con MEM-SS. Se incubaron las células a 37 °C, 5% de CO₂ durante 18 horas.

Al cabo de este tiempo se fijaron las células con 200 µL de paraformaldehído (PFA) al 4% (H₂O más 33% de PBS 3X y 4% de PFA) durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA) y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% en PBS completo (PBT) durante 10 minutos a TA. Posteriormente se bloquearon con albúmina al 1% en PBT (PBT-BSA) durante 1 hora a TA.

Finalmente las células fueron incubadas por 1 hora a TA con 60 µL de diferentes preparaciones del AMC (en forma de líquidos de ascitis) anti-VP2 (6E8/3A8 R1-R6; Svensson *et al.*, 1990) de ratón diluido en PBT. Se probaron diferentes diluciones de dichas preparaciones (1:200→1:128,000) para encontrar aquella que permitiera una visualización óptima de la proteína VP2. El anticuerpo no diluido fue centrifugado durante 2 minutos a velocidad máxima (14,000 rpm) justo antes de usarlo. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBT para retirar el exceso de anticuerpo primario.

Posteriormente, las células se incubaron 1 hora más a TA con 40 µL del anticuerpo secundario conjugado a Alexa 594 ó 488 (Invitrogen) de ratón diluido 1:200 en PBT, el cual también fue centrifugado por 2 minutos a máxima velocidad. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS A para retirar el exceso de anticuerpo secundario.

Se incubaron las células durante 1 minuto con DAPI (SIGMA) en dilución 1:350 (concentración inicial 1 µg/ml). El DAPI fue centrifugado durante 2 minutos a máxima velocidad. Se montó la laminilla con medio de montaje DAKO y se selló el cubreobjetos para su observación al microscopio de fluorescencia. En todos los ensayos realizados posteriormente se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 R4 en dilución 1:10,000 para detectar a la proteína VP2 a menos que se indique lo contrario.

3) Inhibición de la entrada de partículas virales a la célula en tiempos posteriores a 1 hora post-adición del virus.

Con el fin de establecer un procedimiento que permitiera inhibir la entrada de partículas virales a la célula se probaron distintas diluciones del AMC neutralizante 4F8 (amablemente donado por el laboratorio del Dr. Greenberg), solo o en combinación con

un tratamiento de tetracetato de etilenglicol (EGTA) en células BS-C-1 infectadas por rotavirus y se midió la infectividad residual mediante la técnica de titulación por inmunoperoxidasa.

El AMC 4F8 fue producido usando RRV como antígeno y reconoce a la proteína VP7 de la capa externa del virus, es capaz de ser adsorbido a la superficie celular y de esta forma neutralizar la infección (Ruggeri y Greenberg, 1991). El EGTA es un agente quelante de cationes divalentes como el Ca^{2+} , ya que el Ca^{2+} se requiere para mantener la estabilidad de la capa más externa del virus y sin ésta no se lleva a cabo la penetración a la célula, el tratamiento con EGTA disminuye la proporción de partículas infecciosas.

Se sembraron 6×10^4 células BS-C-1 por ml en medio MEM-10 en una placa de 96 pozos y se incubaron a 37 °C y 5% de CO_2 hasta que alcanzaran confluencia total, lo cual normalmente ocurre a los 4 días después de la siembra. Se infectaron dichas células con diluciones seriadas de rotavirus SA11, para lo cual el virus se activó primero con tripsina (concentración final 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 37 °C durante 30 minutos. Cada pozo se infectó con 50 μL de virus. Posterior a la infección las células se incubaron 90 minutos a 4 °C (periodo de adsorción) o 60 minutos a 37 °C (periodo de adsorción y penetración). Posterior al periodo de adsorción o de adsorción/penetración en cada caso, se realizaron dos lavados con MEM-SS a 37 °C y se agregaron 200 μL de EGTA 3 mM previamente calentado a 37 °C, el EGTA se dejó en contacto con las células infectadas durante 1 minuto y se realizaron dos lavados con MEM-SS, se aspiró el medio y se dejaron solo 50 μL . Se añadieron 50 μL del AMC 4F8 en distintas diluciones (1:200, 1:1000 y 1:6000) y se incubó a 4 °C durante 60 minutos. Se lavó exhaustivamente el AMC 4F8 (4 lavados con MEM-SS), se agregaron 200 μL de medio MEM-SS fresco y se regresaron las células a incubación a 37 °C, 5% de CO_2 hasta alcanzar las 15 h PI. Algunas células sólo se trataron con EGTA, otras sólo con el AMC 4F8 y otras no recibieron ninguno de los tratamientos (control).

A las 15 h PI se colocaron las células en hielo durante 15 minutos y se realizó un lavado con PBS-A a 4 °C, posteriormente se realizaron 3 lavados con metanol y se dejaron las células en metanol a -20 °C durante 24 horas para fijarlas. Para llevar a cabo la inmunotinción, se vació el metanol de la caja y se dejó secar. Se lavó una vez con 200 μL de PBS-A y se aspiró dejando sólo 75 μL de éste. Se incubaron las células con 75 μL del suero de conejo R α R 1-5 (1:250) a 37 °C durante 2 horas. Al terminar la

incubación se lavaron las células 3 veces con PBS-A dejando un volumen de 75 μ L y se incubaron con 75 μ L de la proteína A-Biotina diluida en PBS-A (1:1000) a 37 °C durante 2 horas. Se realizaron 3 lavados con PBS-A 1x y se incubó con 75 μ L de Avidina-Peroxidasa diluida en PBS-A (1:1000) durante 1 hora a 37 °C. Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS-A y se incubó con 75 μ L de la solución sustrato (buffer de acetatos, aminoetilcarbazol y H₂O₂) durante 15 minutos a TA y en oscuridad. Una vez que la reacción dio color, se lavaron las células dos veces con agua destilada, se vació ésta y se dejó secar la placa.

Se contaron las células con señal a lo largo del diámetro del pozo utilizando el objetivo de 20X y la dilución de virus en donde había menos de 100 focos infecciosos, se multiplicó el número obtenido por 5 para obtener el número total de células infectadas por pozo. Para calcular el porcentaje de infectividad residual se contó la cantidad de células infectadas en el control y se tomó dicho número como el 100% de infectividad, a partir de ahí se calculó el porcentaje de infectividad al utilizar cada uno de los tratamientos.

4) Cinética de la distribución de VP2 en células BS-C-1 infectadas por rotavirus y tratadas con EGTA y AMC 4F8.

Con el objetivo de analizar la cinética de la distribución de la proteína VP2 se infectaron células BS-C-1 en confluencia con rotavirus cepa SA11 a una MOI de 1.5 UFF/cél (18 h PI) y de 4 UFF/cél (6 y 12 h PI) de la forma descrita anteriormente; se incubaron 1 hora a 37° C, al cabo de la cual se realizaron 2 lavados con 200 μ L de medio MEM-SS. Para inhibir la entrada de partículas virales a la célula, las células se trataron 2 veces con 200 μ L de EGTA 3 mM durante 2.5 minutos, utilizando medio MEM-SS entre cada tratamiento, esto con el objetivo de amortiguar el desprendimiento celular ocasionado por el EGTA. A continuación se agregaron 50 μ L del AMC 4F8 (1:200) y se incubaron las células 1 hora a 4 °C. Al finalizar el tratamiento se hicieron 4 lavados con MEM-SS y se regresaron las células a incubación a 37° C. Se fijaron las células con PFA al 4% durante 15 min. a TA en distintos tiempos post-infección (6, 12 y 18 h PI).

Las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% en PBS completo (PBT) durante 10 minutos a TA y se bloquearon con albúmina al 1% en PBT (PBT-BSA)

durante 1 hora a TA. Posterior al bloqueo fueron incubadas con el AMC anti-VP2 6E8/3A8 de ratón en dilución 1:10,000 así como con el anticuerpo secundario de ratón Alexa 488 en dilución 1:200 de la forma descrita anteriormente. Alternativamente algunas células fueron incubadas también con el suero hiperinmune anti-NSP2 6a de cuyo (producido en el laboratorio del Dr. Padilla) en dilución 1:200 (la dilución óptima para visualizar a NSP2 fue previamente estandarizada en el laboratorio), así como con el anticuerpo secundario Alexa 594 de cuyo (1:200), para así ubicar a NSP2 y por ende a los viroplasma como un punto de referencia para la distribución de VP2.

Por último las células fueron incubadas con DAPI (1:350) y la laminilla fue montada para su observación al microscopio de fluorescencia. Durante la observación de la laminilla se analizaron los siguientes datos:

- proporción de células con VP2 distribuida de forma difusa y proporción de células con VP2 distribuida de forma “difusa más agregados” en cada tiempo post-infección.
- comparación entre los patrones de distribución de VP2 y la morfología de los viroplasma.
- proporción de células con VP2 distribuida de forma difusa al incrementar la multiplicidad de infección.
- número de agregados de VP2 que colocalizan y que no colocalizan con NSP2 por tiempo post-infección.
- área de los agregados de VP2 y NSP2 por tiempo post-infección.
- área de los agregados formados sólo por VP2 y distancia a viroplasma.
- relación entre la señal inmunofluorescente de VP2 difusa y la señal IF de VP2 que forma agregados por célula.

Para obtener las proporciones se contabilizaron más de 100 células y se clasificaron en cada uno de las categorías (difusa o difusa más agregados). La obtención de las áreas e intensidad de la señal inmunofluorescente (IF) se realizó mediante la ayuda del software Image-Pro Plus 6.2. Para calcular la cantidad de proteína difusa y la cantidad de proteína en agregados se multiplicaron los datos del área de cada distribución por su intensidad media de señal. La suma de los datos obtenidos para cada tipo de distribución se consideró como la cantidad de proteína total y a partir de ahí se calculó qué proporción de proteína estaba presente en cada forma de distribución. Los gráficos y las desviaciones estándares se realizaron mediante el paquete GraphPad 5.0.

5) Expresión de VP2 en células MA-104 y BS-C-1 mediante un sistema del virus vaccinia recombinante.

a. Sistema del virus vaccinia recombinante

En este sistema, el gen de interés es clonado en el plásmido pVOTE.1 o pVOTE.2 y luego es incorporado al genoma del virus vaccinia vT7lacOI por recombinación homóloga. Las células son infectadas con este virus vaccinia recombinante en presencia de isopropil-1-tio-D-galactosido (IPTG) y el gen de interés es transcrito por la RNA polimerasa T7 y traducido en el citoplasma de las células infectadas (Figura 14).

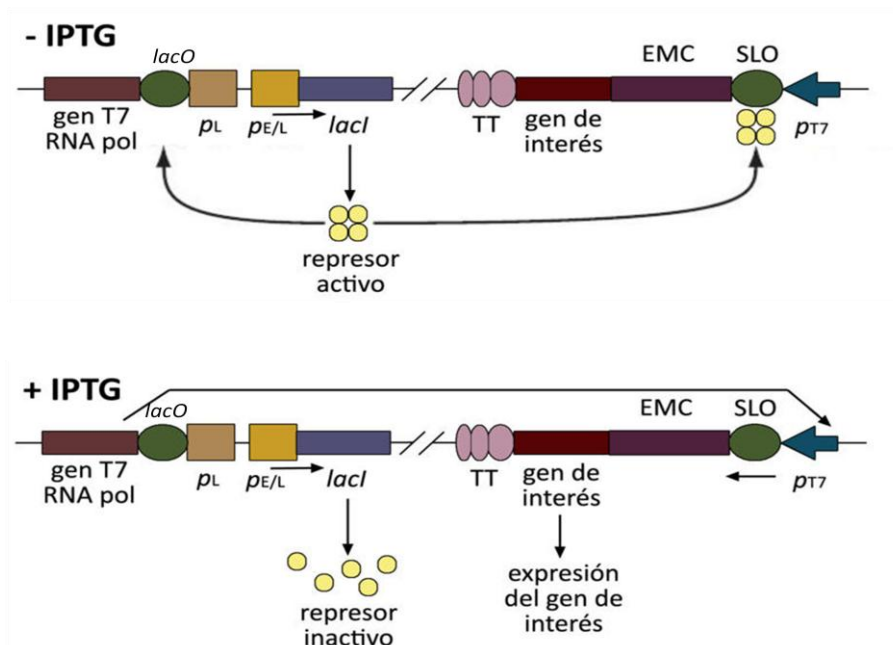


Figura 14. Sistema de expresión VOTE. Se muestran porciones del genoma del virus vaccinia recombinante que contiene elementos regulatorios. La transcripción del gen *lacI* que está bajo el control del promotor temprano/tardío del virus vaccinia (*PE/L*) resulta en la síntesis continua de monómeros de represor (círculos sólidos), el cual se ensambla en tetrámeros y se une a *lacO* adyacente al promotor tardío (*PL*) del virus vaccinia previniendo la transcripción del gen de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (*T7gene1*), gracias a la presencia del operador *lacOI* modificado (*SLO*) que está junto al promotor T7 (*pT7*), previniendo la transcripción del gen blanco. Al inducir, el represor es inactivado, por lo que la RNA polimerasa del virus vaccinia transcribe al gen T7 y se produce RNA polimerasa T7, la cual se une al promotor T7 y transcribe al gen blanco (Modificado de Ward *et al.*, 1995 por L. Martínez Alvarez).

b. Inmunofluorescencia de VP2 en células infectadas por el virus vaccinia recombinante vSA2

Para estudiar la distribución intracelular de la proteína VP2 recombinante expresada mediante un sistema del virus vaccinia recombinante, se sembraron 6×10^4 células MA-104 ó BS-C-1 por ml en medio MEM-10 en una laminilla de 16 pozos, sembrando 200 μL por pozo y se incubaron a 37 °C y 5% de CO_2 hasta que alcanzaran confluencia.

Se infectaron dichas células con el virus vaccinia recombinante vSA2 a una MOI de 2 unidades formadoras de placa por célula (UFP/cél; Elroy-Stein y Moss, 2001; Afrikanova *et al.*, 1998). Como control negativo se utilizó al virus vaccinia vT7lacOI el cual no tiene clonado ningún gen de interés. Para esto, se activaron 10 μL de cada virus diluido en 240 μL de MEM-2.5 con 250 μL de tripsina (concentración final 0.12 mg/ml) a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se realizaron 3 ciclos de sonicación en copa de 20 segundos cada uno a 4 °C, con una amplitud de 80.

Se aspiró el medio de las células y se agregaron 40 μL de medio MEM-2.5 a cada pozo, así como 40 μL de virus activado. Se incubó a 37 °C, 5% de CO_2 . A una h PI se lavó con 200 μL de MEM-2.5 y se agregaron 0.4 μL de IPTG 100 mM (concentración final 200 μM) para inducir la expresión de la proteína VP2 recombinante. Se incubaron las células a 37 °C y 5% de CO_2 hasta las 18 h PI. Se fijaron las células con 200 μL de PFA al 4%, se permeabilizaron con PBT durante 10 minutos y se bloquearon con PBT-BSA durante 1 hora de la forma descrita anteriormente.

Se incubaron las células por 1 hora a TA con 60 μL del AMC anti-VP2 6E8/3A8 de ratón (1:10,000). Posteriormente se incubaron 1 hora más a TA con 40 μL del anticuerpo secundario de ratón Alexa 594 (1:200). Se incubaron las células durante 1 minuto con DAPI (1:350). Finalmente se preparó la laminilla con medio de montaje DAKO y se selló el cubreobjetos para su observación al microscopio de fluorescencia.

6) Expresión de VP2, NSP2 y NSP5 en células BS-C-1 mediante un sistema híbrido de vaccinia.

a. Sistema híbrido de vaccinia

El sistema híbrido difiere del sistema recombinante en que requiere tanto la infección con un virus vaccinia como también la transfección con un plásmido. Este es un sistema transitorio de expresión citoplásmica que se basa en la síntesis de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 en el citoplasma de células de mamífero. Para comenzar, un gen de interés es insertado en un plásmido (en este caso pVOTE.1) de tal manera que queda bajo el control del promotor de la RNA polimerasa T7 (*PT7*). Mediante transfección mediada por liposomas, el plásmido recombinante es introducido al citoplasma de células infectadas por vTF7-3, un virus vaccinia recombinante que codifica y produce en forma constitutiva a la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Durante la incubación, el gen de interés se transcribe con gran eficiencia por la RNA polimerasa T7, y el RNAm producido es luego traducido con alta eficiencia gracias a la presencia de un sitio interno de iniciación de la traducción (IRES) del virus de la encefalomiocarditis (EMC; Elroy-Stein y Moss, 2001).

b. Inmunofluorescencia de VP2 y NSP2 en células que expresan a VP2, NSP2 y NSP5 mediante el sistema híbrido de vaccinia.

Para determinar la distribución que sigue la proteína VP2 cuando es expresada junto con otras proteínas es necesario utilizar el sistema híbrido de vaccinia ya que el sistema recombinante tan sólo nos permite la expresión de una proteína a la vez. Se utilizaron células de riñón de mono BS-C-1 para la coexpresión de VP2, NSP2 y NSP5. Dichas células se cultivaron hasta alcanzar confluencia de la forma descrita anteriormente.

Se infectaron las células con el virus vaccinia vTF7-3 a una MOI de 1 UFP/cél, dicho virus dirige la expresión de la RNA polimerasa T7. A una h PI las células se cotransfectaron con el plásmido pVOTE-VP2 para la expresión de VP2, pVOTE-NSP2 para la expresión de NSP2, pVOTE-NSP5 para la expresión de NSP5, o con los tres

plásmidos simultáneamente, pVOTE-VP2, pVOTE-NSP2 y pVOTE-NSP5 para la coexpresión de las tres proteínas virales. Como controles negativos, algunas células fueron infectadas por el virus vTF7-3 pero no se transfeció a los plásmidos, mientras que otras sólo recibieron a los plásmidos pero no se infectaron.

El virus vTF7-3 se activó con tripsina a 37 °C durante 30 minutos y posteriormente se dieron 3 ciclos de sonicación de la forma descrita anteriormente. Se aspiró el medio de las células y se agregaron 40 µL de MEM-2.5 y 40 µL de virus activado y diluido, se incubaron las células durante 1 hora a 37 °C, 5% de CO₂.

Media hora antes de terminar la primera h PI, se preparó la mezcla de transfección. En tubos de poliestireno se colocaron 25 µL de medio Optimem sin suero (Invitrogen) y se añadieron 2 µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). En tubos diferentes se agregaron 25 µL de medio Optimem sin suero y el equivalente a 60 ng del plásmido correspondiente. Se dejaron incubar por 5 minutos a temperatura ambiente después de los cuales se mezcló la Lipofectamina con el plásmido dejándolos incubar 20 minutos más a temperatura ambiente.

Al culminar la primera hora de infección se retiró el virus lavando una vez con MEM-2.5, se añadió la mezcla de transfección y se incubó por 3 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Al cabo de este tiempo, se retiró el medio de transfección lavando dos veces con Optimem y se añadieron 200 µL de medio Optimem suplementado con 10% de suero fetal de bovino (Optimem-10). Se incubaron las células a 37 °C, 5% de CO₂ hasta alcanzar las 20 h PI.

Finalmente, se fijaron las células y se incubaron con los distintos anticuerpos de la forma ya descrita. Se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 de ratón en dilución 1:10,000 así como el anticuerpo secundario de ratón Alexa 488 (1:200) para ubicar a VP2, además del suero anti-NSP2 6a de cuyo en dilución 1:200 junto con el anticuerpo secundario de cuyo Alexa 594 (1:200) para ubicar a los VLSs. Se montó la laminilla para su observación al microscopio de fluorescencia.

X. Resultados

1) Distribución intracelular de VP2 en células MA-104 y BS-C-1 infectadas por rotavirus SA11, mediante microscopía de fluorescencia.

Con el objetivo de encontrar la dilución del AMC anti-VP2 que proporcionara una señal óptima de la proteína se infectaron células MA-104 con rotavirus SA11 a una MOI de 0.8 de la forma descrita en la metodología. A las 18 h PI se fijaron las células y se incubaron con cuatro diferentes preparaciones del AMC anti-VP2 de ratón (6E8/3A8 R1, R2, R4 y R5) a diferentes diluciones (1:200→1:128,000) durante 1 h a temperatura ambiente (TA) así como con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón Alexa 594 en dilución 1:200 durante 1 h a TA.

Al analizar las células al microscopio de fluorescencia, se observó señal aún en las diluciones más altas (1:128,000), se determinó que la dilución óptima para todos los líquidos de ascitis anti-VP2 está entre 1:10,000 y 1:16,000. En experimentos posteriores se utilizó solamente la preparación del AMC 6E8/3A8 R4 en dilución 1:10,000.

A continuación quisimos describir la distribución intracelular de la proteína VP2 en células MA-104 y BS-C-1 infectadas por rotavirus SA11. Para ello, se infectaron éstas a una MOI de 0.8 y se fijaron las células a las 18 h PI de la forma descrita en la metodología. Se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000) para visualizar a VP2 así como el suero anti-NSP2 6a (1:200) para visualizar a NSP2. Encontramos que en células infectadas por rotavirus, VP2 forma agregados que se ubican en viroplasma (medidos a partir de la proteína NSP2; Figura 15). Sin embargo, es notable en éste y en experimentos posteriores que a pesar de que VP2 está en agregados, una proporción importante de la señal se ubica siempre de manera difusa en el citoplasma.

Al analizar con detenimiento la tinción de la proteína VP2 se observó que ésta presenta dos patrones de distribución tanto en células MA-104 como en BS-C-1. En el primero, dicha proteína se encuentra distribuida de manera difusa a lo largo de todo el citosol, mientras que en el segundo la proteína se encuentra en agregados citoplásmicos mayoritariamente esféricos y de tamaños variables (Figura 16). Al primer tipo de distribución se le denominó “difusa”, mientras que al segundo se le llamó “difusa más agregados”, debido a que en una misma célula es posible observar una fracción de VP2

formando agregados y otra fracción distribuida difusamente. Las células no infectadas funcionan como controles.

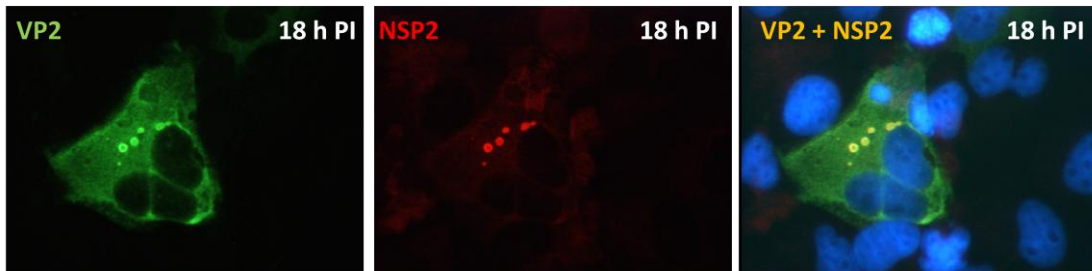


Figura 15. VP2 forma agregados que se ubican en viroplasmos. Células BSC1 se infectaron por SA11 y se fijaron a las 18 h PI. Se utilizó el AMC 6E8/3A8 R4 (1:10,000) así como el suero anti-NSP2 (1:200) para visualizar a VP2 y NSP2 por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó el objetivo 60X.

Se utilizaron dos tipos celulares con el objetivo de examinar si la distribución de VP2 era igual en ambos. Del mismo modo, se utilizaron dos fluoróforos (rojo y verde) para discriminar cuál de ellos proporcionaba una señal mejor de la proteína. Se encontró que la tinción de VP2 es buena con ambos fluoróforos. Sin embargo, dado que la mejor señal de NSP2 se obtiene con el fluoróforo rojo (Alexa 594), en todos los ensayos siguientes la tinción de VP2 se realizó con el anticuerpo secundario Alexa 488 el cual da una señal de color verde.

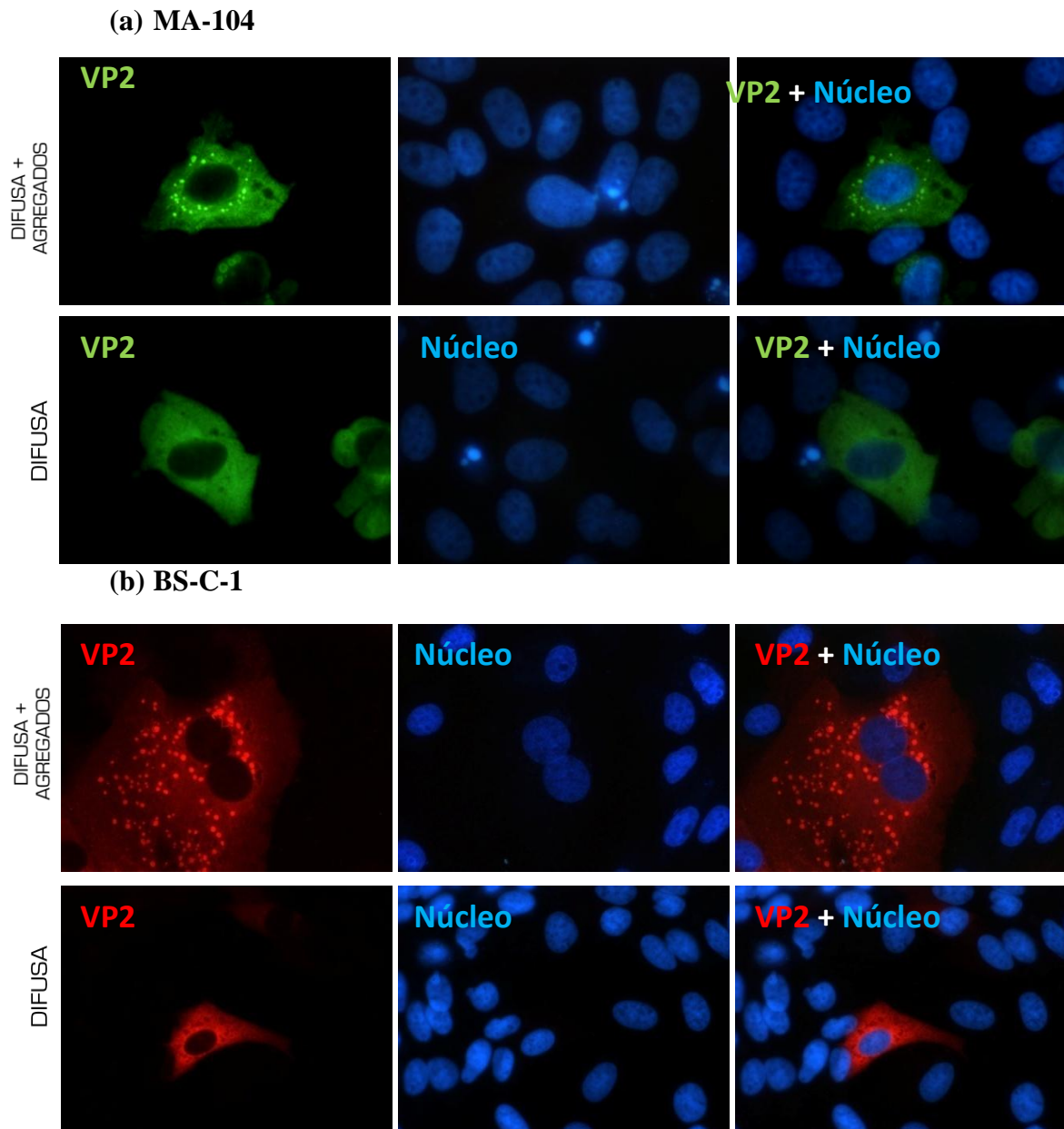


Figura 16. Distribución de VP2 en células MA-104 y BS-C-1 infectadas por SA11. Las células se fijaron a las 18 h PI. Se utilizó el AMC 6E8/3A8 R4 (1:10,000) para visualizar a VP2 por microscopía de epifluorescencia. (a) Se observa a VP2 distribuida de forma difusa más agregados citoplásmicos (arriba) o sólo de forma difusa en el citosol (abajo). (b) Se observan los mismos patrones de distribución en células BS-C-1 infectadas por rotavirus. En todos los paneles se utilizó el objetivo 60X con la excepción del panel inferior del inciso (b) en donde se utilizó el objetivo 40X.

2) Cinética de la distribución de VP2

a. Inhibición de la entrada de partículas virales a la célula en tiempos posteriores a una hora post-adición del virus.

Debido a que para nuestros ensayos necesitábamos tener la certeza de estar tratando con células que representaran el tiempo post-infección indicado (con una ventana de 1 hora menos como máximo) se diseñó un procedimiento para inhibir la entrada de partículas virales por tratamiento con EGTA y con el AMC 4F8. El EGTA elimina la capa externa viral y en consecuencia la infectividad del virus. En estos ensayos se utilizó EGTA 3 mM debido a que es la concentración reportada como suficiente para inhibir la entrada del virus (Ayala-Bretón *et al.*, 2009). El AMC 4F8 neutraliza al rotavirus SA11 a través de su interacción con la proteína de superficie VP7 (Ruggeri y Greenberg, 1991). Para estos ensayos utilizamos al AMC 4F8 en diluciones 1:200, 1:1000 y 1:6000. Se ha reportado que el AMC 4F8 a una concentración de 20 µg/ml, neutraliza al virus RRV pre-adsorbido a las células con un 99% de efectividad (Ruggeri y Greenberg, 1991). La concentración típica de IgG en líquidos de ascitis murinos está en el intervalo de 1-10 mg/ml (Harlow y Lane, 1998), lo cual significa que en la dilución más baja utilizada (1:200) tendríamos por lo menos 5 µg/ml de IgG's y como máximo 50 µg/ml de IgG's

Se siguieron los dos procedimientos descritos en la metodología. En primera instancia, no se permitió al virus penetrar a la célula debido a que la infección se realizó a 4 °C durante 90 minutos y al finalizar este periodo se aplicaron los diferentes tratamientos. Es importante señalar que siguiendo este procedimiento en condiciones óptimas se podría neutralizar completamente la infectividad viral.

Una vez alcanzadas las 15 h PI se tiñeron las células por inmunoperoxidasa y se realizaron conteos de focos virales en células no tratadas los cuales se utilizaron como el 100% de infectividad. Posteriormente se contabilizaron los focos virales en cada uno de los tratamientos y se calculó el porcentaje de infectividad con respecto al control. A esta infectividad se le conoce como infectividad residual ya que es la infectividad que permanece aún después de un tratamiento como es el EGTA o el AMC 4F8.

Se encontró que el tratamiento de 1 minuto con EGTA 3 mM sólo logra reducir la infectividad residual en aproximadamente un 20% (Figura 17). Tratamientos mayores a

los 5 minutos inician el desprendimiento de la monocapa celular (datos no mostrados). Por el contrario, el AMC neutralizante 4F8 en dilución 1:200 resultó ser el mejor tratamiento para inhibir la entrada de partículas virales a la célula, ya que sólo se observa un 5% de infectividad residual en células con dicho tratamiento. En otras palabras, el rango máximo de error que se puede obtener al utilizar el AMC 4F8 es de 0.05. Diluciones mayores de este anticuerpo (1:1000 y 1:6000) no fueron tan efectivas (se observa un 20 y 70% de infectividad residual respectivamente). No existen diferencias entre células infectadas por rotavirus y tratadas con el AMC 4F8 y células infectadas tratadas con el AMC 4F8 y EGTA (Figura 17). Los resultados anteriores sugieren que el tratamiento con el AMC 4F8 (1:200) es eficiente para neutralizar el virus adherido a la superficie celular y, por ende, bloquear la entrada del virus a la célula.

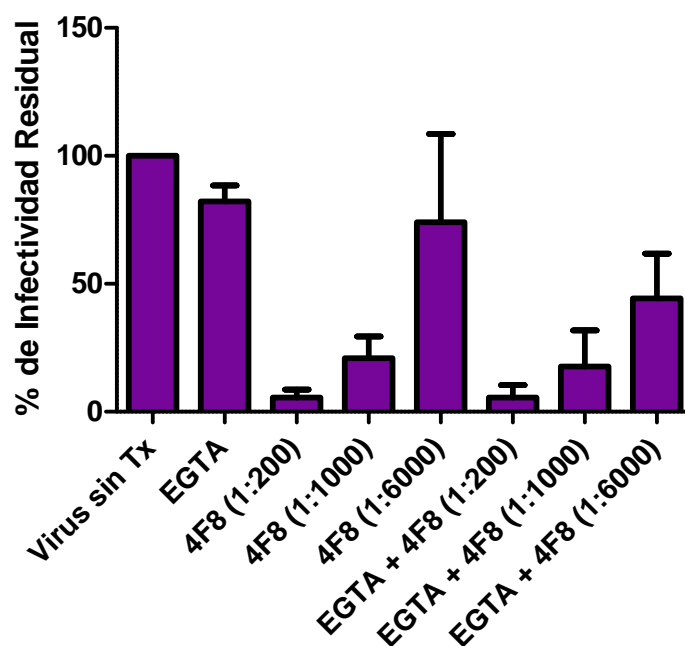


Figura 17. Efecto del EGTA y del AMC 4F8 sobre el virus previo a la infección. En el gráfico se muestra el porcentaje de infectividad residual determinado por la técnica de inmunoperoxidasa al tratar células BS-C-1 con virus adsorbido a 4 °C, y posteriormente tratando con EGTA 3 mM, AMC 4F8 (1:200, 1:1000 y 1:6000) o ambos. Tx = tratamiento.

A continuación realizamos un ensayo muy similar con la única diferencia de que en esta ocasión, permitimos la entrada del virus a la célula al incubar durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se aplicaron los diferentes tratamientos y una vez alcanzadas las 15 h PI se tiñeron las células por inmunoperoxidasa. Se realizaron conteos de focos virales

remanentes con cada uno de los tratamientos, se utilizó el conteo de células infectadas por rotavirus y no tratadas con EGTA ni con el AMC 4F8 (Control) como el 100% y a partir de ahí se calculó el porcentaje de infectividad residual en cada uno de los tratamientos.

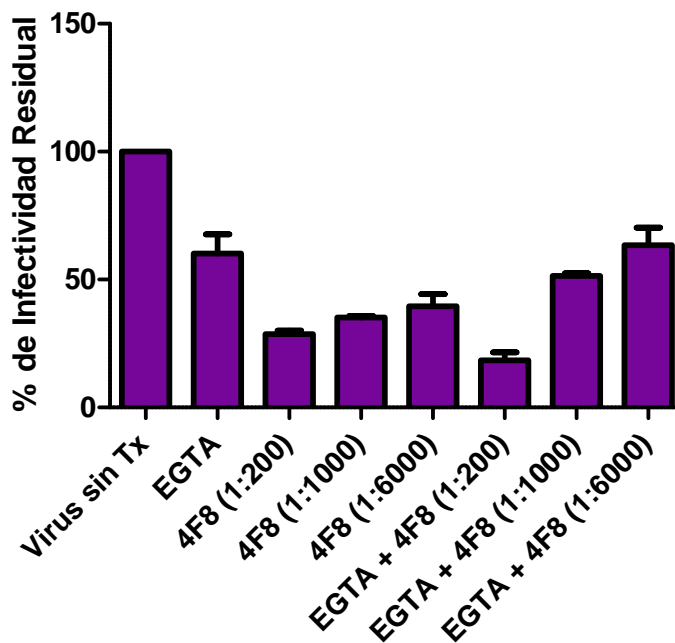


Figura 18. Efecto del EGTA y del AMC 4F8 sobre el virus posterior a la infección. En el gráfico se muestra el porcentaje de infectividad residual permitiendo 1 hora de adsorción y penetración a 37 °C, y neutralizando el virus que no haya entrado a las células con EGTA 3 mM, AMC 4F8 (1:200, 1:1000 y 1:6000) o ambos.

Se encontró que del 100% de partículas virales que entran a la célula cuando no se utiliza el EGTA y el AMC 4F8, tan sólo el 28% logra entrar una vez que se utiliza el AMC 4F8 (1:200) para neutralizar a rotavirus. Si consideramos los datos de la gráfica anterior que establecen que el AMC 4F8 (1:200) neutraliza al menos el 95% de las partículas virales adsorbidas a la superficie celular, esto querría decir que de 100 partículas virales que entran a la célula cuando no se realiza el tratamiento con EGTA y el AMC 4F8, tan sólo 28 ± 5 lo hacen durante la primera h PI y el resto lo estarían haciendo a distintos tiempos posteriores (Figura 18). De acuerdo a nuestros resultados, el EGTA en combinación con el AMC 4F8 (1:200) contribuye a evitar con mayor eficiencia este fenómeno, ya que se observó una infectividad de tan sólo el 18% con estos tratamientos (Figura 18). Por lo tanto, el tratamiento conjunto de EGTA y AMC 4F8 en dichas condiciones reduce significativamente la fracción de células BS-C-1

infectadas por SA11; mientras que en diluciones mayores del AMC 4F8 (1:1000 y 1:6000) no se observa un efecto sumatorio del EGTA.

Con base en lo anterior, se decidió establecer el siguiente procedimiento para inhibir la entrada de partículas virales en tiempos posteriores a 1 hora post-adición del virus. Se optó por dos tratamientos de EGTA 3 mM a 37 °C de 2.5 minutos cada uno una vez transcurrida la primera h PI, ya que tratamientos de 1 minuto resultaron poco eficientes y tratamientos mayores a 5 minutos originan el desprendimiento de la monocapa celular. Seguido a esto incubación durante 60 minutos a 4 °C con el AMC 4F8. De esta forma nos aseguraríamos de que no entraran partículas virales a la célula en tiempos posteriores a la primera hora post-adición del virus. En otras palabras, con este tratamiento tenemos la certeza de que las células estudiadas corresponden al tiempo post-infección indicado o como máximo, a una h PI menos.

b. Cinética de la distribución de VP2 en células BS-C-1 infectadas por SA11 y tratadas con EGTA y el AMC neutralizante 4F8.

Con el fin de conocer los patrones de distribución de la proteína VP2 durante la infección por rotavirus se infectaron células BS-C-1 con SA11 a una MOI de 1.5 (18 h PI) y de 4 (6 y 12 h PI). Se permitió un periodo de adsorción/penetración de 1 hora a 37 °C, posterior al cual se sincronizó la infección utilizando EGTA y el AMC 4F8 de la forma descrita en la metodología y se regresaron las células a incubación para fijarlas a distintos tiempos post-infección (6-18 h PI). Se incubó con el AMC anti-VP2 6E8/3A8 de ratón en dilución 1:10,000 durante 1 hora a TA para visualizar a VP2 así como con el suero anti-NSP2 6a de cuyo en dilución 1:200 durante 1 hora a TA para visualizar a NSP2 y por ende a los viroplasmos. Finalmente, se incubaron las células con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón Alexa 488 y anti-IgG de cuyo Alexa 594 respectivamente, ambos en dilución 1:200 durante 1 hora a TA. En todos los experimentos posteriores se utilizó el suero anti-NSP2 6a de cuyo y las mismas combinaciones de anticuerpos secundarios.

- Proporción de células con VP2 distribuida de forma difusa y proporción de células con VP2 distribuida de forma “difusa más agregados” en distintos tiempos post-infección.

Con el objetivo de conocer en qué proporción era posible encontrar cada uno de los patrones de distribución de la proteína VP2 en células infectadas por rotavirus se contabilizaron células con cada uno de los dos tipos de distribución. En todos los t PI encontramos células con VP2 difusa o VP2 difusa más agregados (Figura 19). Se realizó el experimento por triplicado, contando 100 células en cada t PI y se obtuvieron los promedios de las proporciones de células con cada uno de los fenotipos de VP2. Como se aprecia en la Figura 20, al utilizar EGTA y el AMC 4F8 para inhibir la entrada de partículas virales a la célula, se observa que la proporción de células con el fenotipo de VP2 distribuida difusamente es baja (menor al 5%) y se mantiene relativamente constante a lo largo de la infección viral, aunque es posible apreciar un ligero aumento en la proporción de células con VP2 distribuida de manera difusa a las 18 h PI.

Conjuntamente, se analizó la proporción de células infectadas no tratadas con EGTA y el AMC 4F8 que presentaron cada uno de los fenotipos de distribución de VP2. También en esta condición se observan los dos patrones de distribución de VP2 en cada uno de los t PI, sin embargo, encontramos que al no utilizar el EGTA y el AMC 4F8, la proporción de células con VP2 distribuida sólo de forma difusa es mucho mayor que cuando inhibimos la entrada de partículas virales a la célula mediante el EGTA y el AMC 4F8, y que dicha proporción es significativa a lo largo de la infección viral (Figura 21).

En infecciones en donde se inhibió la entrada de partículas virales a la célula mediante el tratamiento con EGTA y el AMC 4F8, a las 6 h PI la gran mayoría de las células infectadas ya presentan a VP2 en forma de agregados. Se intentó detectar a VP2 en tiempos más tempranos (3 y 4 h PI), sin embargo debido a las limitaciones de la técnica fue difícil su visualización y en las pocas observaciones que se hicieron dicha proteína ya se encontraba formando agregados (datos no mostrados).

Al utilizar EGTA y el AMC 4F8 disminuimos en gran medida la posibilidad de que existan ciclos de reinfecciones posteriores al tiempo de adición del virus. El hecho de que en estas condiciones, se siga observando un pequeño porcentaje de células que presentan a VP2 distribuida de forma difusa sugiere que dichas células no representan

infecciones virales tempranas y son el resultado de otro tipo de fenómeno como podría ser una infección viral no exitosa.

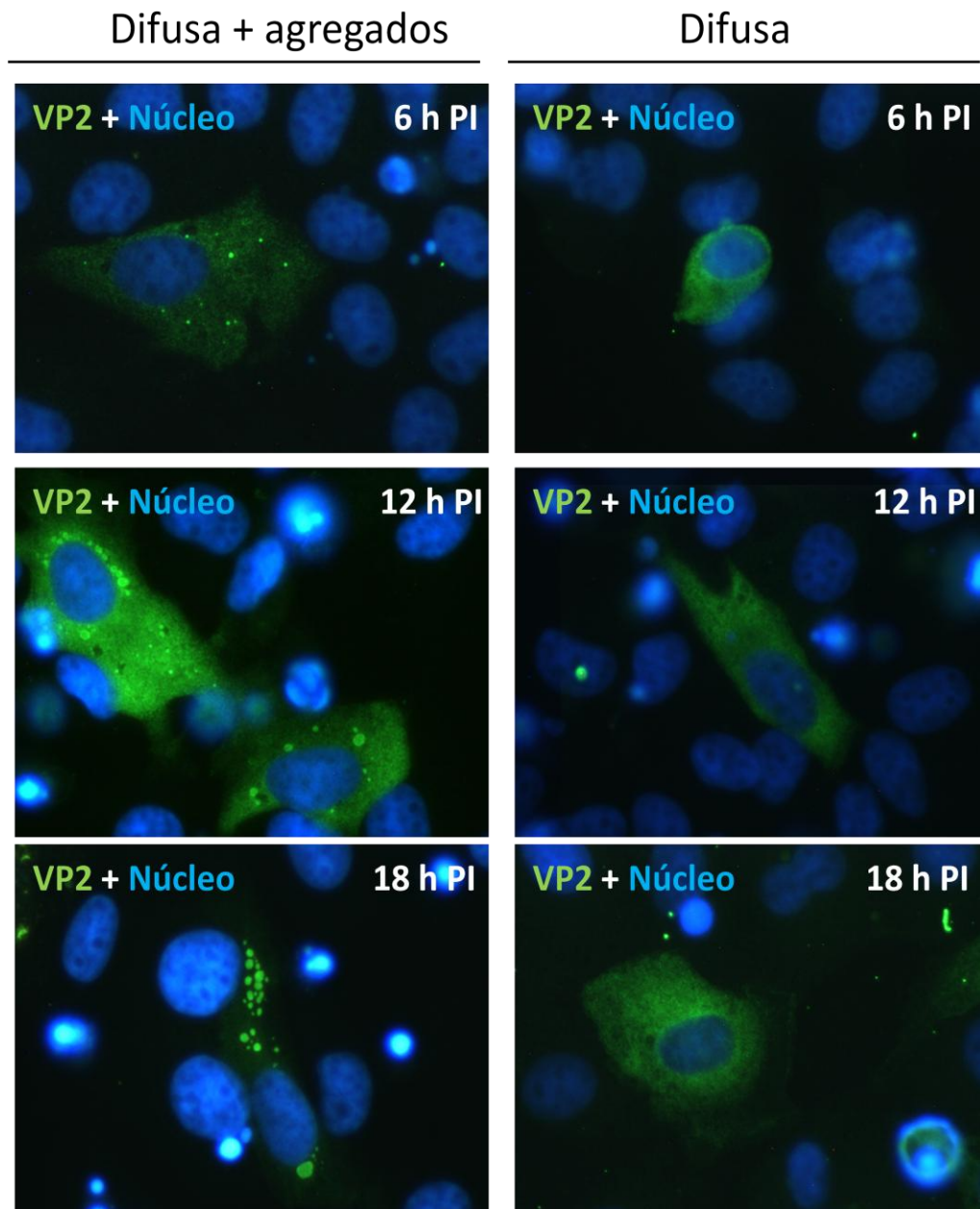


Figura 19. Patrones de distribución de VP2. Células BS-C-1 se infectaron con rotavirus, a una h PI se sincronizó la infección con EGTA 3 mM y el AMC 4F8. Se fijaron las células a las 6, 12 y 18 h PI y se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000) para visualizar a VP2 por microscopía de epifluorescencia. Se utilizó el objetivo 60X.

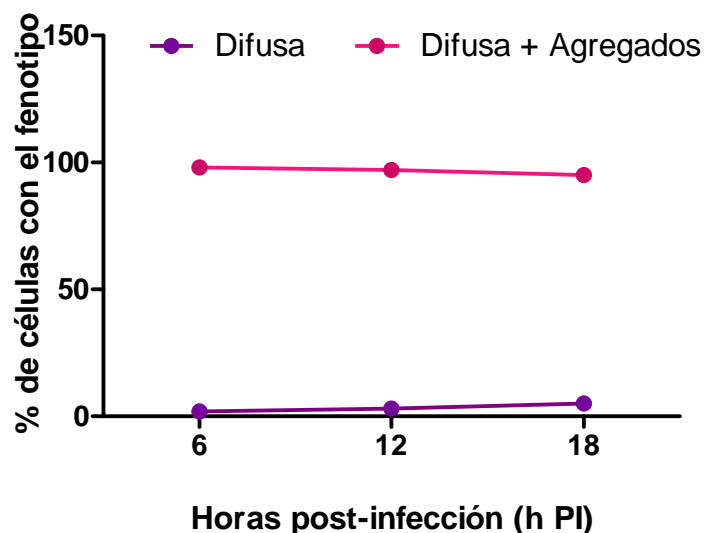


Figura 20. Proporción de células con VP2 difusa y con VP2 difusa más agregados por t PI en infecciones de células BSC1 con el rotavirus SA11 tratadas con EGTA y el AMC 4F8. El gráfico muestra el porcentaje de células con el fenotipo VP2 difusa o el fenotipo VP2 difusa más agregados a lo largo de la infección por rotavirus. Se contabilizaron 100 células y se muestra el promedio de tres experimentos independientes.

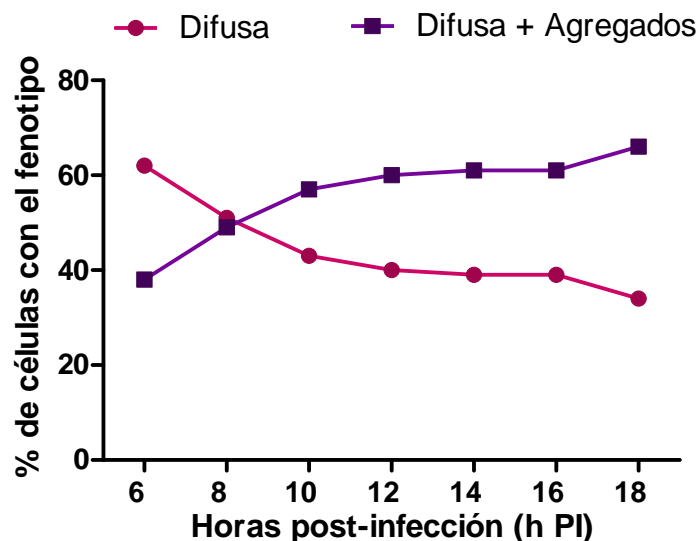


Figura 21. Proporción de células con VP2 difusa y con VP2 difusa más agregados por t PI en infecciones no tratadas con EGTA y el AMC 4F8 de células BSC1 con el rotavirus SA11. El gráfico muestra el porcentaje de células con VP2 distribuida difusamente o VP2 distribuida de forma difusa más agregados a lo largo de la infección por rotavirus. Se muestran los datos de un sólo experimento.

- Comparación entre los patrones de distribución de VP2 y la morfología de los viroplasmos.

Posteriormente, quisimos conocer si los viroplasmos, medidos a partir de la proteína NSP2 la cual es marcador de estas estructuras, presentaban una morfología regular y semejante a la reportada cuando la proteína VP2 presentaba cada uno de los patrones de distribución ya mencionados

Se encontró que, en infecciones en las cuales se inhibió o no la entrada de partículas virales a la célula, cuando VP2 se encuentra distribuida de forma difusa más agregados, NSP2 se distribuye en viroplasmos con una morfología regular (Figura 22 y 23, arriba). Sin embargo, en esas mismas células una fracción de la proteína NSP2 se encuentra distribuida también de forma difusa. Por otra parte, en células donde la proteína VP2 se encuentra distribuida de forma difusa hay alteraciones en el tamaño, forma y número de viroplasmos (Figura 22 y 23, abajo) o incluso se encontraron células que al parecer carecían de éstos. Es importante mencionar que el suero hiperinmune anti-NSP2 utilizado en estos ensayos da cierta señal de fondo, a diferencia del AMC anti-VP2 el cual nos dio una señal libre de fondo.

A pesar de que el tratamiento con EGTA y el AMC 4F8 tiene como consecuencia la disminución de la proporción de células que presentan a VP2 distribuida de forma difusa, encontramos que, al igual que en células infectadas sin haber recibido este tratamiento, dicho fenotipo se correlaciona con una alteración en la forma, tamaño y número de los viroplasmos. Ya que los viroplasmos son los sitios en donde ocurre la replicación y el ensamblaje viral, creemos que la distribución difusa de la proteína VP2 podría ser un marcador importante de infecciones aberrantes.

El hecho de que algunas infecciones por rotavirus no sean productivas puede deberse a múltiples factores. Una posible explicación vendría dada por la fase del ciclo celular en la cual el virus penetró a la célula, ya que podría no ser la más conveniente para lograr el éxito de la infección viral. Por otro lado, se sabe que en virus de DNA y de RNA se producen partículas virales DI, las cuales son defectivas en su replicación (Perrault, J., 1981; Giachetti y Holland, 1989). Coinfecciones mediadas por éstas y por partículas silvestres no son exitosas. Pensamos que como hipótesis alternativa a la anterior, las infecciones no productivas que observamos en este estudio podrían representar infecciones mixtas mediadas por partículas DI y silvestres de rotavirus.

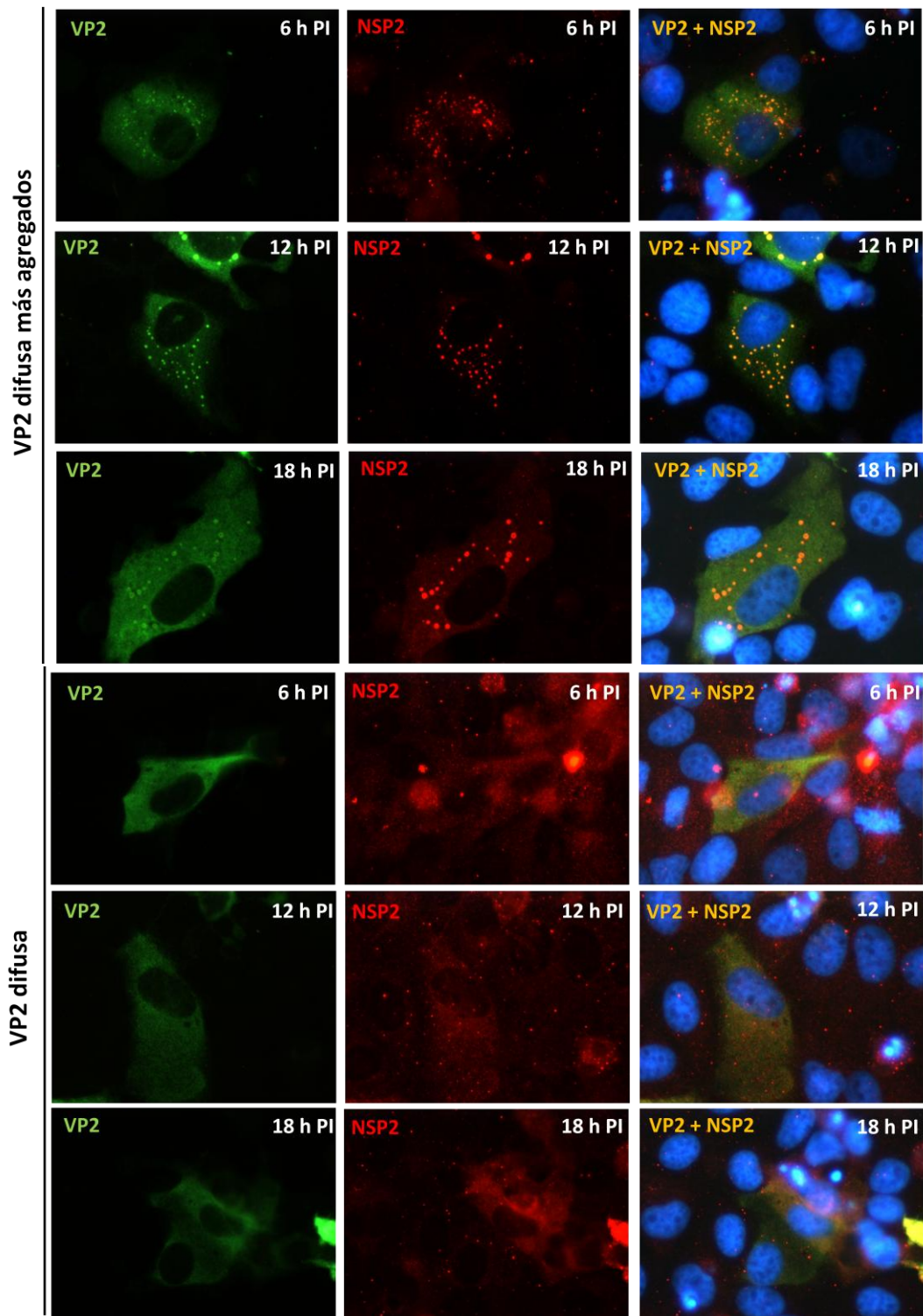


Figura 22. Comparación entre los patrones de distribución de VP2 y la morfología de los viroplasmos en infecciones no tratadas con EGTA y el AMC 4F8. Células BS-C-1 fueron infectadas por SA11 y el inóculo fue retirado a una hora PI. Se fijaron a tiempos indicados. Se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000) para visualizar a VP2 así como el suero anti-NSP2 6a (1:200) para visualizar a NSP2 por microscopía de epifluorescencia utilizando el objetivo 60X. Se observa que una distribución de la forma difusa más agregados de VP2 se relaciona con una morfología regular de los viroplasmos (medidos a partir de NSP2), mientras que la distribución difusa se asocia con morfología alterada de éstos (abajo).

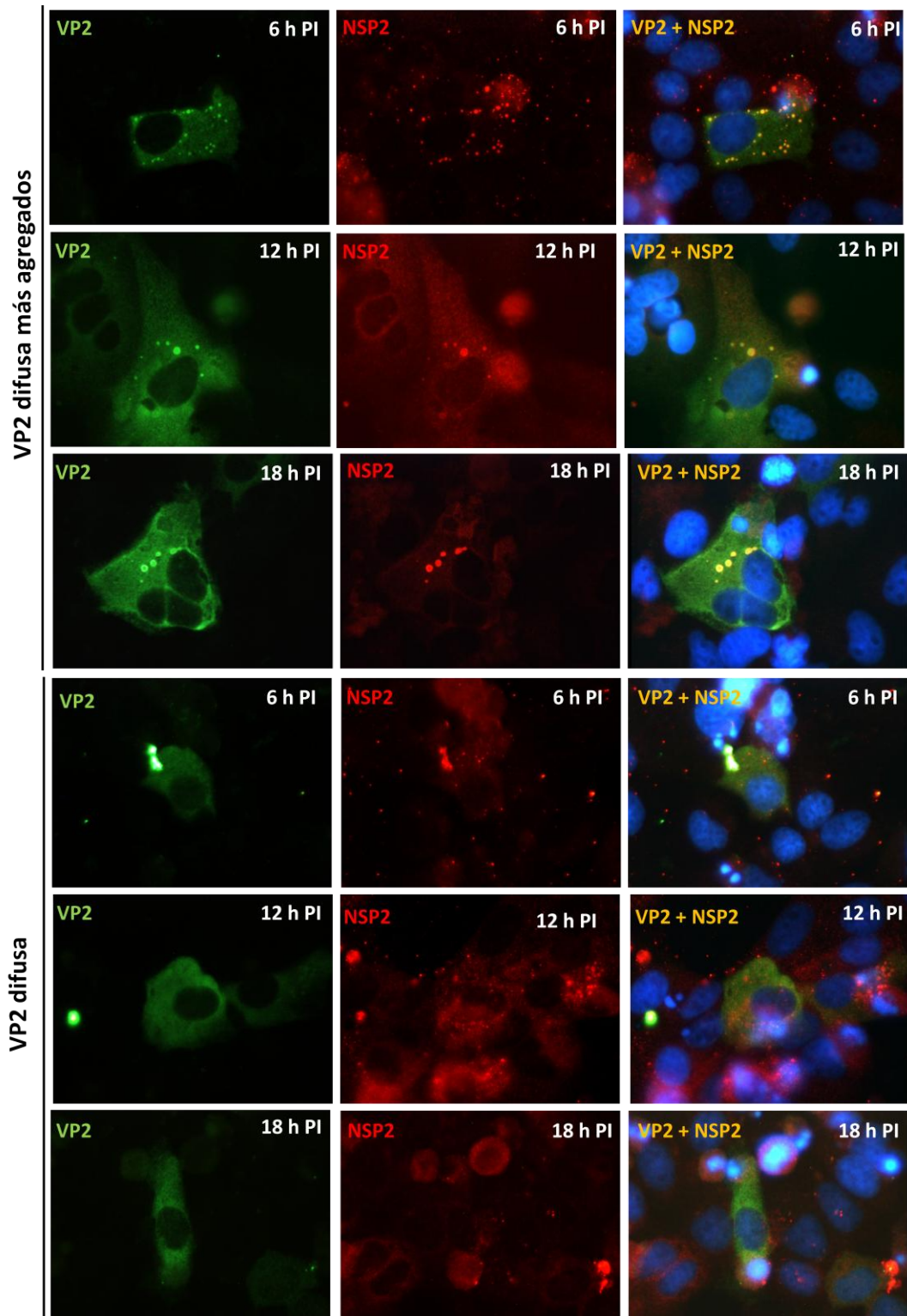


Figura 23. Comparación entre los patrones de distribución de VP2 y la morfología de los viroplasmata en infecciones tratadas con EGTA y el AMC 4F8. Se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000) para visualizar a VP2 así como el suero anti-NSP2 6a (1:200) para visualizar a NSP2 por microscopía de epifluorescencia utilizando el objetivo 60X. Se observa que una distribución de la forma difusa más agregados de VP2 se relaciona con una morfología regular de los viroplasmata (arriba). La distribución difusa de VP2 se relaciona con una morfología alterada de éstos (abajo).

- Proporción de células con VP2 distribuida de forma difusa al incrementar la multiplicidad de infección.

Con el fin de explorar un poco más la hipótesis de que las infecciones aberrantes de rotavirus están mediadas por partículas DI y silvestres planteamos el siguiente experimento. Nos preguntamos si al infectar con multiplicidades mayores de infección, y de esta forma, propiciar que más de una partícula viral entre a una misma célula, se vería incrementada la proporción de éstas que contienen a VP2 distribuida de manera difusa.

Para esto, se infectaron células BS-C-1 por rotavirus SA11 a una MOI de 0.25, 1.25, 4.0 y 10, se permitió un periodo de adsorción/penetración de 1 hora a 37 °C, posterior al cual se sincronizó la infección utilizando EGTA y el AMC 4F8 de la forma descrita en la metodología y se regresaron las células a incubación para fijarlas a las 12 h PI. Se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000), así como el anticuerpo secundario Alexa 488 (1:200) para visualizar a VP2 por la técnica de inmunofluorescencia.

Al infectar con una MOI de 0.25 o de 1.25 no encontramos células que presentaran la distribución difusa de VP2. Del mismo modo, al utilizar una MOI de 4 la proporción de células con VP2 distribuida difusamente fue muy baja (menor al 5%). No obstante, cuando infectamos con una MOI de 10 encontramos que aproximadamente un cuarto de las células presentaron el fenotipo de VP2 distribuida de forma difusa (Figura 24).

Al incrementar la MOI se propicia que más de una partícula viral penetre una misma célula y, por consiguiente, la probabilidad de que partículas DI entren junto con las silvestres aumenta. El hecho de observar un aumento en la proporción de células con VP2 distribuida de manera difusa podría representar una consecuencia de esto.

Estos resultados sugieren que el incremento en la proporción de células infectadas que presentan a la proteína VP2 distribuida difusamente se debe a la entrada de partículas virales DI y silvestres a la célula. Debido al fenómeno de interferencia entre las partículas defectivas y las silvestres, el cual siempre culmina en la dominancia de las primeras sobre las segundas, dichas infecciones no serían exitosas.

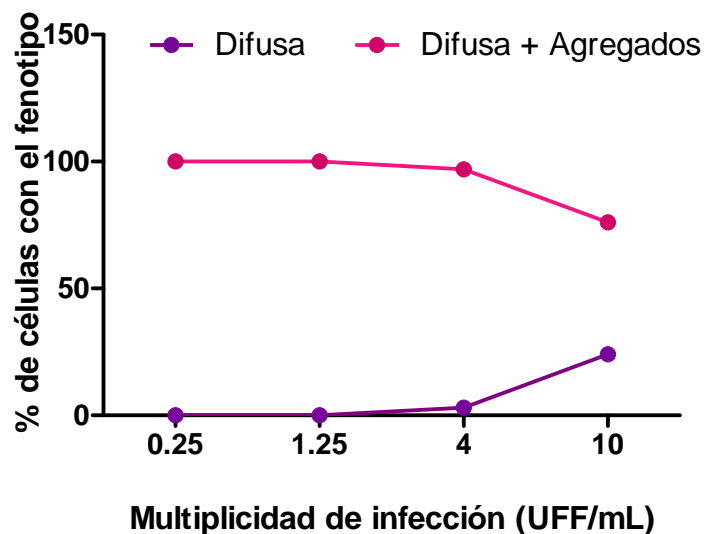


Figura 24. Proporción de células con VP2 distribuida de forma difusa al infectar y tratar con EGTA y el AMC 4F8 células BSC1 con rotavirus SA11 a multiplicidades de infección cada vez mayores. El gráfico muestra el porcentaje de células con el fenotipo VP2 difusa o el fenotipo VP2 difusa más agregados a un solo tiempo (12 h PI) y al infectar con diferentes MOIs. Se contabilizaron 100 células y se muestra el promedio de tres experimentos independientes.

- Número de agregados de VP2 que colocalizan y que no colocalizan con NSP2 por tiempo post-infección.

Para determinar la proporción de agregados de VP2 que colocalizan y que no colocalizan con NSP2 (viroplasmias), se fotografiaron agregados de VP2 y de NSP2 en células infectadas por rotavirus a cada tiempo PI, se realizaron los sobrelapes de estas imágenes y se observó si dichas inclusiones colocalizaban. Se encontró que la gran mayoría de los agregados de VP2 colocalizan con NSP2 (Figura 25, arriba), aunque en algunas células fue posible encontrar unos pocos agregados que no colocalizan con NSP2 (Figura 25, abajo).

Para corroborar los datos de colocalización de agregados de VP2 con agregados de NSP2 se tomaron fotografías de microscopía confocal de células infectadas por rotavirus a cada tiempo PI. Se obtuvieron planos cada 1 μm utilizando la función de Z del microscopio confocal Olympus FV1000 (Figura 26). Dichas fotografías confirmaron

que los agregados de VP2 colocaliza con aquellos de NSP2 en la mayoría de los planos obtenidos, aunque en algunos casos, ciertos agregados de VP2 no colocalizaron con NSP2 en todos los planos del eje Z. Como ya se ha mencionado, se observó que una fracción de la proteína VP2 y de NSP2 se distribuye de forma difusa.

Estos resultados sugieren que los agregados de VP2 se ubican en los viroplasma aunque la colocalización de VP2 con NSP2 no siempre es total. La razón de esto último podría ser una diferencia en el tamaño de los agregados de VP2 y de NSP2, de esta manera, los agregados más pequeños no alcanzarían a cubrir el volumen de los más grandes.

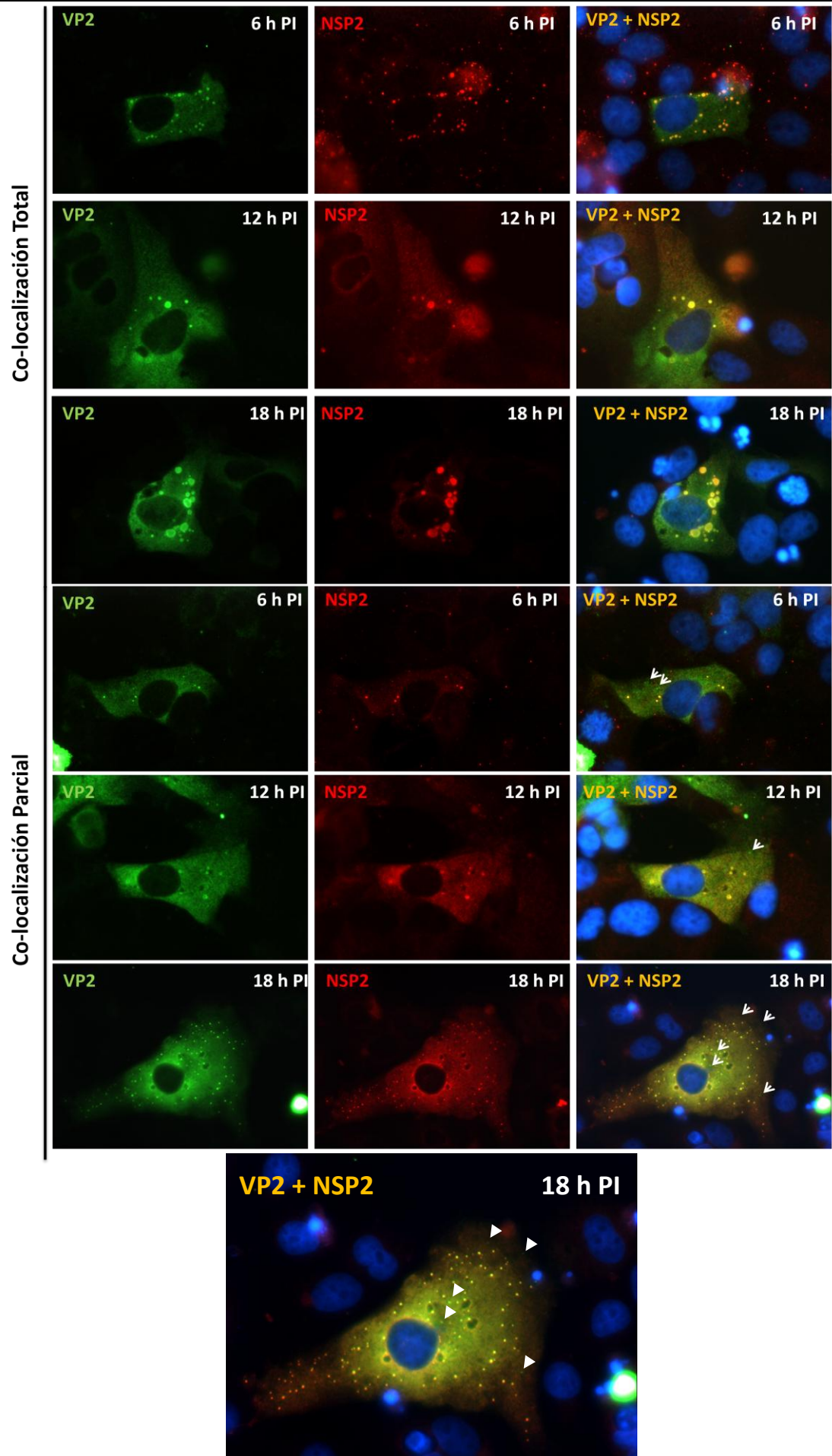
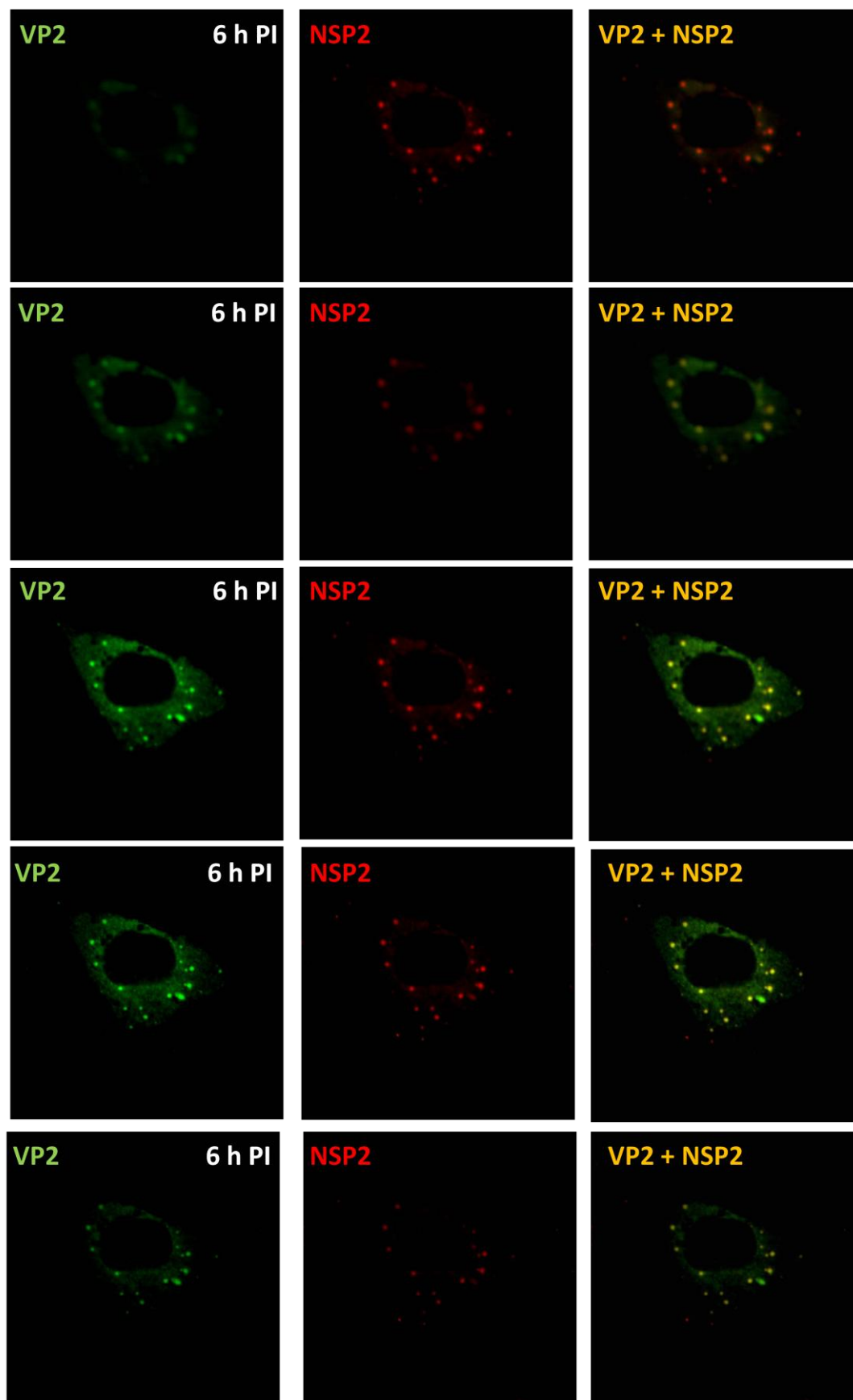
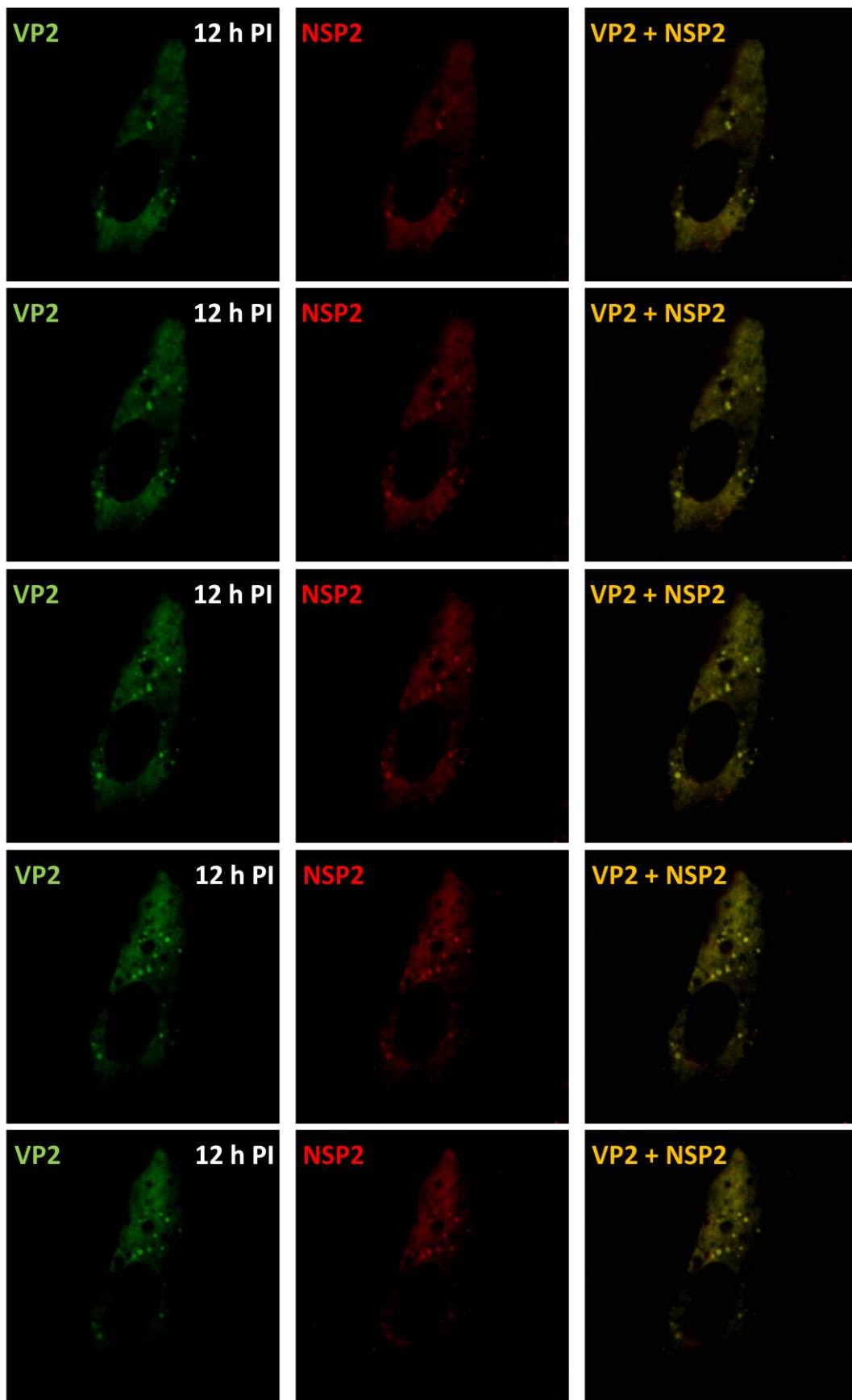


Figura 25. Colocalización de agregados de VP2 con agregados de NSP2 (viroplasmata). Células BS-C-1 infectadas por rotavirus y fijadas a distintos tiempos PI. Las células se trataron con EGTA y el AMC 4F8. Se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000) para visualizar a VP2 así como el suero anti-NSP2 6a (1:200) para visualizar a NSP2 (viroplasmata) por microscopía de epifluorescencia utilizando el objetivo 60X. Arriba se muestra la colocalización total de VP2 con NSP2. Abajo se muestran algunas células con agregados de VP2 que no colocalizan con NSP2. Las flechas blancas indican dichos agregados. La última imagen es un aumento de la anterior con el fin de mejorar la visualización de los pequeños agregados de VP2 que no colocalizan con NSP2.

(a)



(b)



(c)

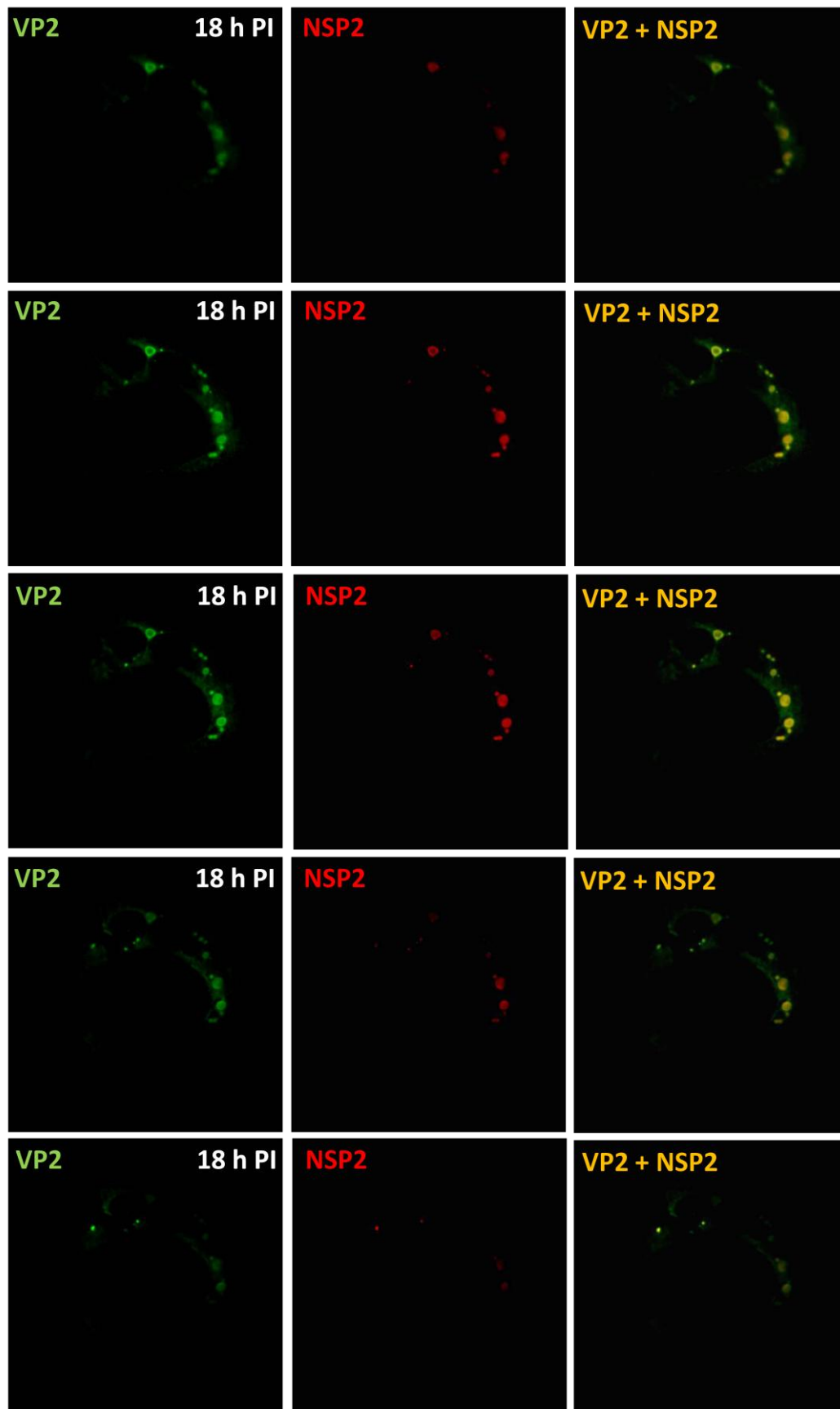


Figura 26. Colocalización de agregados de VP2 con agregados NSP2 por microscopía confocal. Células BS-C-1 fueron infectadas por rotavirus y fijadas a distintos tiempos PI. Las células se trataron con EGTA y el AMC 4F8. Se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000) para visualizar a VP2 así como el suero anti-NSP2 6a (1:200) para visualizar a NSP2 (viroplasmos) por la técnica de inmunofluorescencia. (a)-(c) Microscopía confocal de células infectadas por SA11 a las 6, 12 y 18 h PI respectivamente. Las imágenes se obtuvieron en intervalos de 1 μm utilizando la función de Z del microscopio confocal Olympus FV1000, es posible observar que VP2 colocaliza completamente con NSP2 en cada uno de los planos.

Finalmente, se cuantificó el número de agregados de VP2 por célula que no colocalizan con agregados de NSP2 en comparación con el número de agregados de VP2 que si colocalizan con NSP2 (Figura 27).

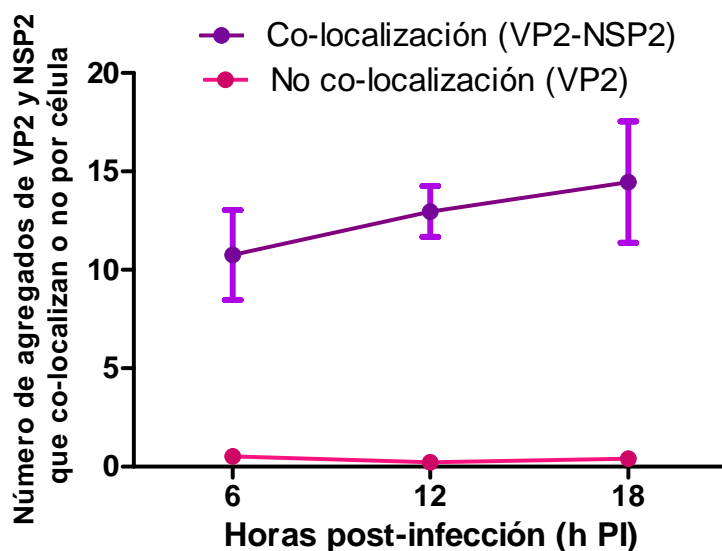


Figura 27. Comparación entre la colocalización y la no colocalización de VP2 y NSP2. El gráfico muestra el promedio de agregados de VP2 que colocalizan y que no colocalizan con NSP2 en células BSC1 infectadas con el rotavirus SA11 por t PI. Se muestran los promedios de tres experimentos independientes.

Se encontró que el número de agregados de VP2 que no colocalizan con NSP2 es muy bajo (Figura 25 y 27). En todos los tiempos PI pero no en todas las células, fue posible encontrar agregados de VP2 que no colocalizan con los viroplasmos. El número de dichos agregados es bajo y se mantiene relativamente constante a lo largo de la infección.

- Área de los agregados de VP2 y de NSP2 por tiempo post-infección.

Se ha reportado que el área de los viroplasmos aumenta de tamaño durante la infección por rotavirus (Eichwald *et al.*, 2004). Debido a que los agregados formados por VP2 se localizan en los viroplasmos quisimos conocer si el área de estos agregados que colocalizan con NSP2 también aumenta de tamaño durante la infección viral. Se determinó el área de los agregados formados por VP2 y por NSP2 mediante la ayuda del software Image-Pro Plus v. 6.2. Se midió el área de los agregados totales de 20 células por cada t PI y se obtuvo el promedio del área de estos agregados por t PI. Como referencia, se midió el área de los agregados formados por NSP2 siguiendo el mismo procedimiento. Estos experimentos se realizaron por triplicado y se muestra el promedio de los tres ensayos. Se observó una tendencia de ambas inclusiones a aumentar de tamaño conforme avanza la infección, siendo mucho más pronunciado el aumento entre las 12 y las 18 h PI (Figuras 25, 26 y 28). En la Figura 29 se aprecia un halo de NSP2 rodeando a los agregados de VP2, lo cual sugiere que la ubicación de VP2 en los viroplasmos es central mientras que la de NSP2 está más orientada hacia la periferia.

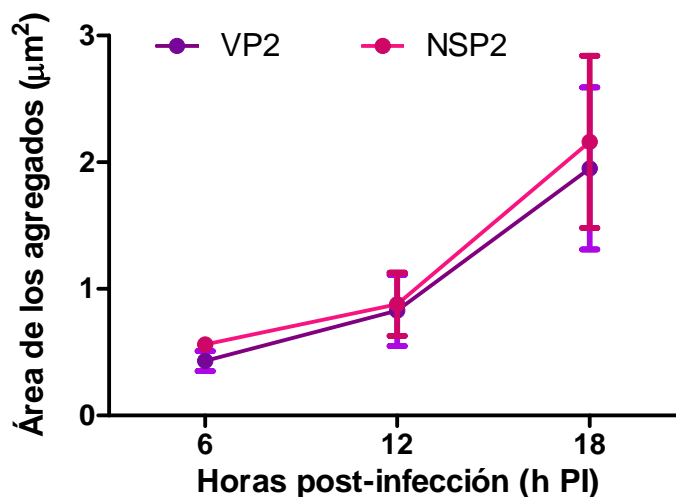


Figura 28. Área de los agregados formados por VP2 y por NSP2. El gráfico muestra el área promedio de los agregados formados por VP2 y por NSP2 durante la infección por rotavirus. Se observa un aumento en el área de ambos. Se contabilizaron todos los agregados de VP2 que colocalizaban con NSP2 presentes en 20 células por cada tiempo PI (en promedio 13 agregados por célula). Se muestran los promedios de tres experimentos independientes.

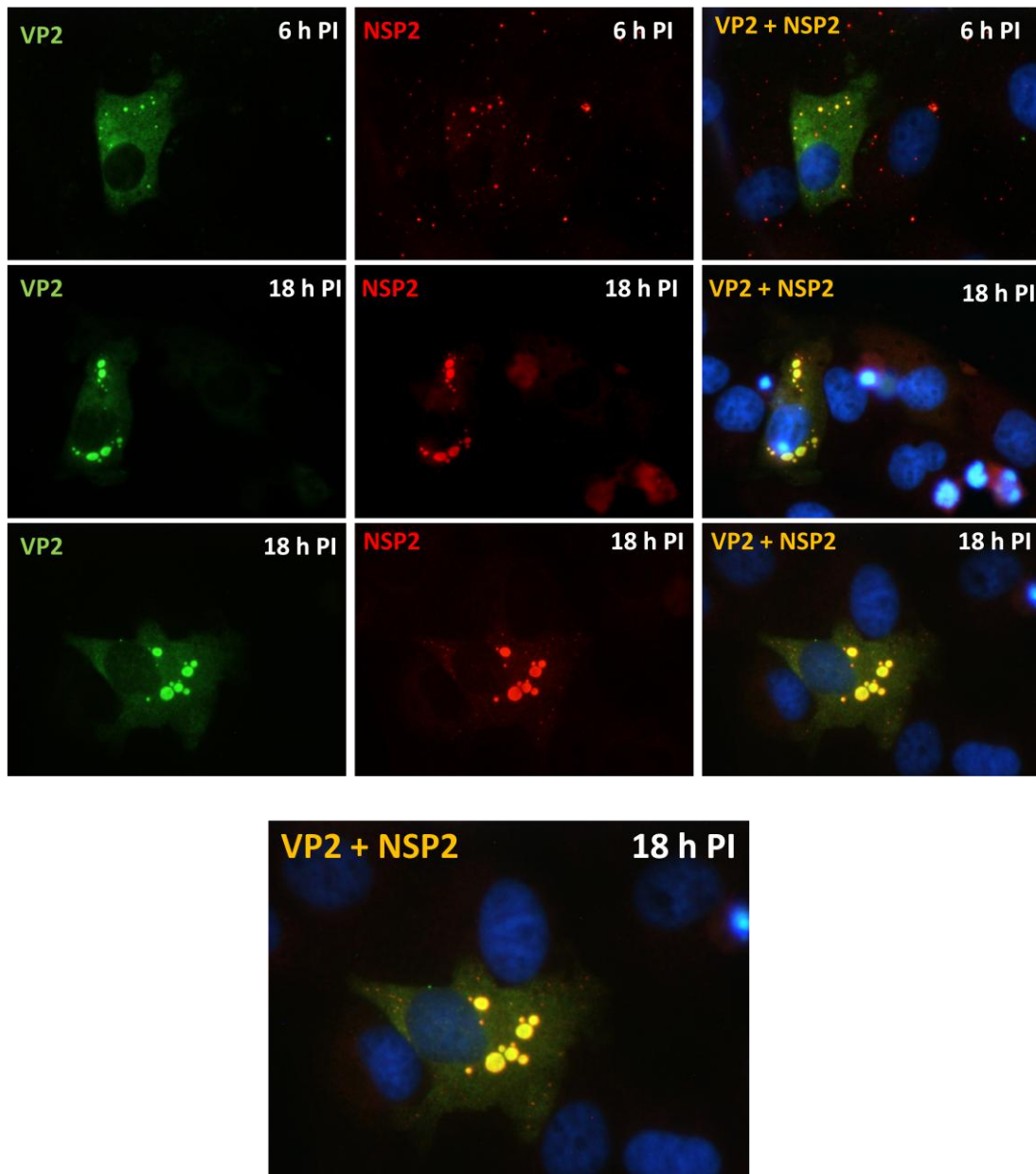


Figura 29. La localización de VP2 en los viroplasmas es central. Células BS-C-1 fueron infectadas por SA11 y fijadas a distintos tiempos PI. Las células se trataron con EGTA y el AMC 4F8. Se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000) para visualizar a VP2 así como el suero anti-NSP2 6a (1:200) para visualizar a NSP2 (viroplasmata) por microscopía de epifluorescencia utilizando el objetivo 60X. Es posible apreciar un halo de NSP2 (rojo) alrededor de VP2. Abajo se muestra la última imagen ampliada para apreciar mejor el halo de NSP2.

- Área de los agregados formados sólo por VP2 y distancia al viroplasma más cercano.

Con el objetivo de conocer si los agregados formados sólo por la proteína VP2 aumentan de tamaño a lo largo de la infección, presentan cierta tendencia a desplazarse hacia los viroplasmata, o por el contrario, mantienen una distribución diferente a éstos se procedió a medir el área de estos agregados así como la distancia al viroplasma más cercano en infecciones tratadas con EGTA y el AMC 4F8. Se midió el área de todos los agregados formados sólo por la proteína VP2 de cada t PI mediante la ayuda del software Image Pro-Plus v. 6.2, así como su distancia a viroplasmata. En las Figuras 30 y 31 se muestran los promedios de tres experimentos independientes.

Se encontró que los agregados formados sólo por la proteína VP2 se encuentran en un intervalo de tamaño que va de $0.29 \mu\text{m}^2$ a $0.38 \mu\text{m}^2$. Como se observa en la Figura 30, no existe una tendencia de los agregados formados sólo por la proteína VP2 a aumentar de tamaño conforme avanza la infección por rotavirus.

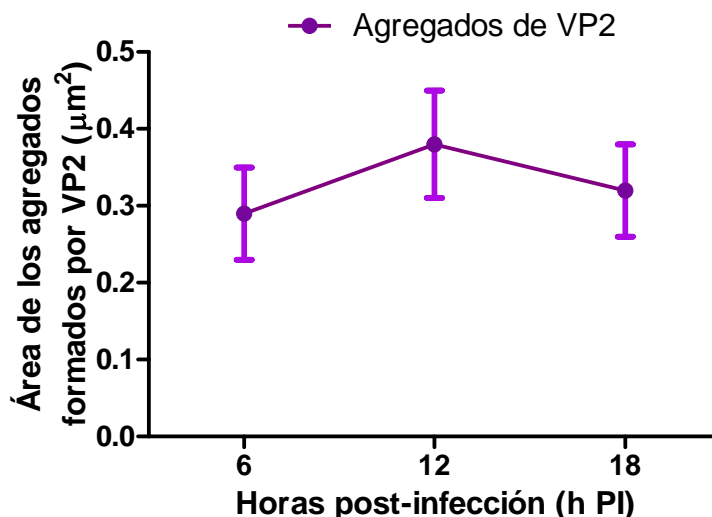


Figura 30. Área de los agregados formados sólo por VP2. El gráfico muestra el área de los agregados formados por VP2 que no colocalizan con NSP2 (viroplasmata) en células BSC1 infectadas con el rotavirus SA11. Se contabilizaron los agregados encontrados en 20 células (aproximadamente 70) y se muestran los promedios de tres experimentos independientes.

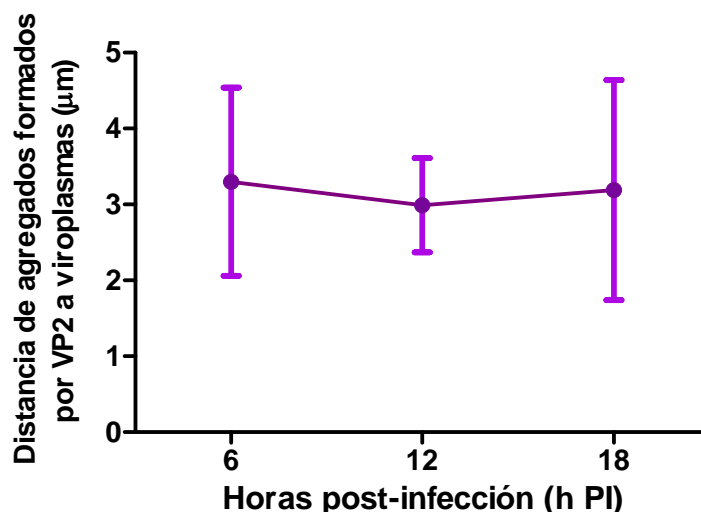


Figura 31. Distancia de los agregados de VP2 al viroplasma más cercano. El gráfico muestra la distancia de los agregados formados por VP2 y que no colocalizan con NSP2 hacia los viroplasmos en células BSC1 infectadas con el rotavirus SA11. Se contabilizaron los agregados encontrados en 20 células (aproximadamente 70) y se muestran los promedios de tres experimentos independientes.

Del mismo modo se encontró que la distancia de los agregados formados por VP2 hacia NSP2 es relativamente constante a lo largo de la infección por rotavirus (Figura 31). Esto sugiere que los agregados formados por VP2 no se están dirigiendo hacia los agregados formados por NSP2, sino que mantienen una distribución discreta o independiente de éstos. Estos datos apuntan a que los agregados formados sólo por VP2 no parecen fusionarse con viroplasmos auténticos en células infectadas por rotavirus.

- Descripción de agregados formados por NSP2 pero no por VP2.

Durante el análisis de la cinética que sigue la proteína VP2 en células infectadas por rotavirus y tratadas con EGTA y el AMC 4F8 notamos que existen células en donde la proteína VP2 no abarca toda la zona del citosol, sino que existen zonas del citosol que no se observan con tinción de esta proteína. Sin embargo, al observar el campo que correspondía a la proteína NSP2, se encontró que muchas veces estas zonas donde VP2 no estaba presente coincidían con zonas donde se ubicaba NSP2 (Figura 32). Esto último parece indicar que durante las infecciones por rotavirus existen errores que

conducen a la formación de estructuras aberrantes que carecen de algún constituyente básico de los viroplasmatas como es la proteína VP2 y que por ende, son diferentes de los viroplasmatas auténticos. Es importante resaltar que este fenómeno sólo se observó a las 18 h PI, que es el tiempo en donde los viroplasmatas alcanzan el mayor tamaño y ya se ha completado el ciclo replicativo viral.

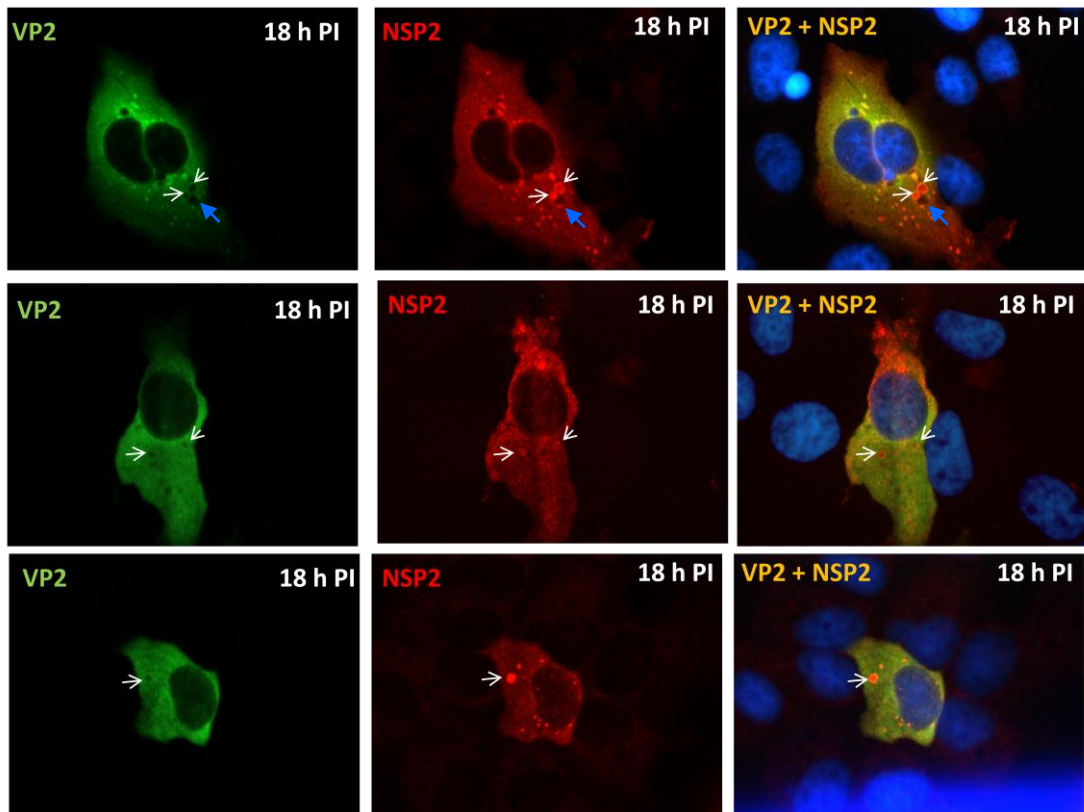


Figura 32. Agregados de NSP2 que carecen de VP2. Células BS-C-1 fueron infectadas por SA11 y fijadas a distintos tiempo PI. Las células fueron tratadas con EGTA y el AMC 4F8. Se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000) para visualizar a VP2 así como el suero anti-NSP2 6a (1:200) para visualizar a NSP2 (viroplasmatas) por microscopía de epifluorescencia utilizando el objetivo 60X. Las flechas blancas indican cada uno de los casos en donde hay ausencia de VP2 y presencia de NSP2. En el panel superior se muestra una célula con una zona que carece tanto de tinción de VP2 como de NSP2 (flecha azul).

- Relación entre la señal de VP2 difusa y la señal de VP2 que forma agregados por célula.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, es claro que la distribución predominante de VP2 es la que hemos denominado “difusa más agregados”. Para describir un poco más esta distribución se utilizaron herramientas del software Image-Pro Plus v. 6.2, las cuales nos permitieron determinar la superficie de la célula en la cual VP2 se encuentra de forma difusa así como el área total de los agregados de VP2 en cada t PI. Del mismo modo se obtuvo la intensidad promedio de la señal difusa así como la intensidad de la señal de los agregados. La Figura 33 ejemplifica el área y las intensidades de cada tipo de señal: difusa y en agregados. Multiplicando los datos del área y de la intensidad fue posible calcular la cantidad de proteína VP2 difusa y compararla con la cantidad de proteína VP2 en agregados por cada célula (ver metodología; Figura 34).

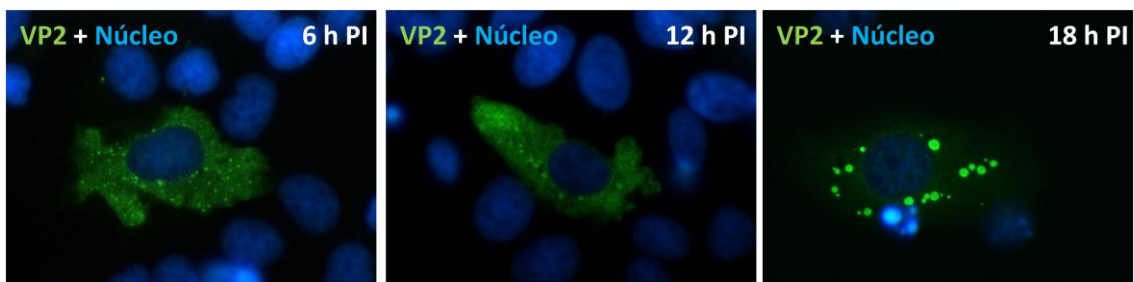
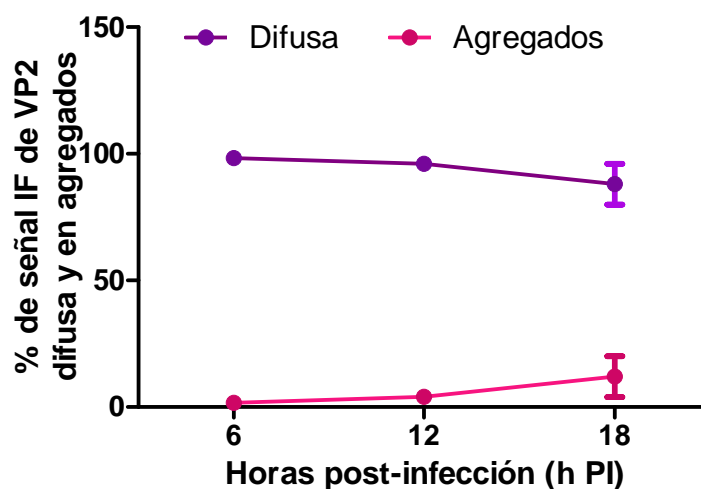


Figura 33. Señal de inmunofluorescencia (IF) de VP2 difusa y señal IF de VP2 que forma agregados por célula. Células BS-C-1 fueron infectadas por SA11 y fijadas a distintos tiempos PI. Se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000) para visualizar a VP2 por microscopía de epifluorescencia utilizando el objetivo 60X.

De acuerdo a nuestros resultados, una fracción minoritaria de VP2 se encuentra formando los agregados. A las 6 h PI menos del 2% de la proteína se encuentra en estas estructuras, mientras que a las 18 h PI la acumulación de VP2 en agregados llega a ser mayor al 10%. Sin embargo, en todos los tiempos PI la proporción de la señal IF de VP2 que se encuentra difusa es predominante sobre la proporción de VP2 en agregados, lo cual conlleva a reflexionar sobre una posible función de VP2 en el citosol. Recientemente se descubrió que la proteína VP2 es capaz de estabilizar la vida media de los mensajeros virales, función que podría ser compatible con su distribución en el citosol.



Señal IF de VP2				
		Tiempo (h PI)		
		6	12	18
Difusa	Área (μm^2)	580.5	761	889.21
	Intensidad (u arbitrarias)	27.76	26.16	32.5
Agregados	Área (μm^2)	3.66	11.11	33.07
	Intensidad (u arbitrarias)	75.38	74.46	118.28

Figura 34. Relación entre la señal IF de VP2 difusa y la señal IF de VP2 que forma agregados por célula. El gráfico muestra la proporción de VP2 que se encuentra de forma difusa así como la proporción de VP2 que se encuentra formando agregados determinadas a partir de los datos del área y de la intensidad de VP2 a cada t PI (mostrados en la tabla). Se contabilizaron 20 células con el fenotipo de VP2 “difusa más agregados” para cada tiempo por experimento y se muestran los promedios de tres experimentos independientes.

Con el fin de comparar la distribución de VP2 con la de otra proteína viral se analizó el patrón de distribución de la proteína NSP2. NSP2 es una proteína que tradicionalmente se ha ubicado en viroplasmos, por lo que se observan grandes agregados citosólicos al hacer la tinción por inmunofluorescencia. Sin embargo, una fracción de NSP2 también se distribuye de manera difusa (Figura 35). Por lo tanto, se determinó la proporción de la proteína NSP2 que se encuentra distribuida de forma difusa a partir de datos de área y de intensidad de la señal siguiendo el mismo procedimiento utilizado para VP2, así como la proporción de NSP2 que está en los viroplasmos (Figura 36).

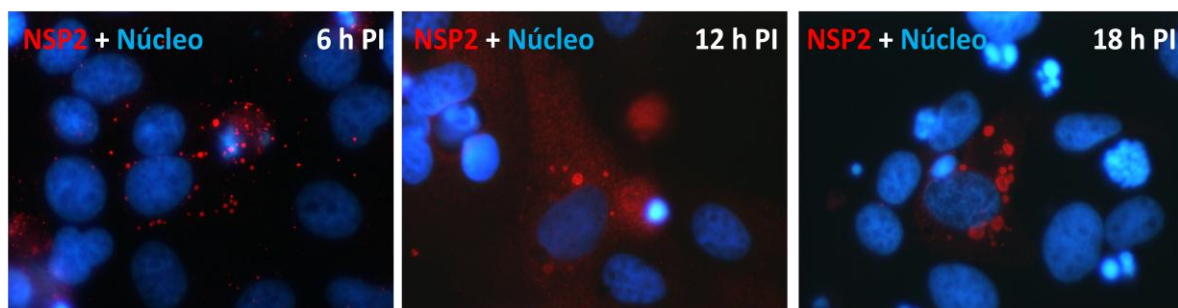
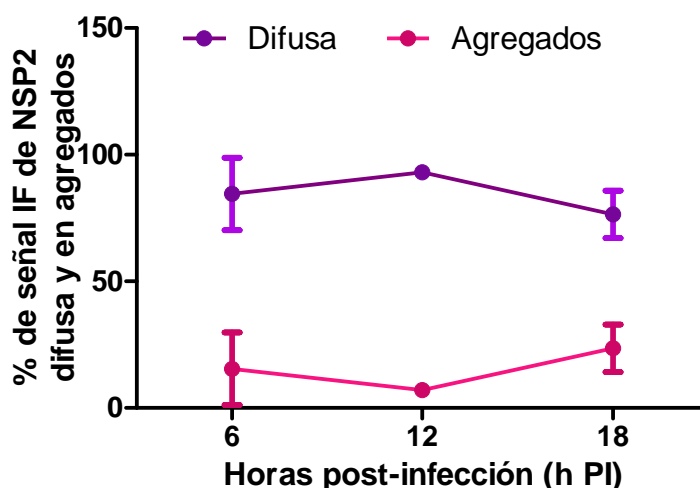


Figura 35. Señal IF de NSP2 difusa y señal IF de NSP2 que forma agregados. Células BS-C-1 fueron infectadas por SA11 y fijadas a distintos tiempos PI. Se utilizó el suero anti-NSP2 6a (1:200) para visualizar a NSP2 por microscopía de epifluorescencia utilizando el objetivo 60X. La intensidad de la fracción difusa de NSP2 es menor que la de VP2.



Señal IF de NSP2				
		Tiempo (h PI)		
		6	12	18
Difusa	Área (μm^2)	374.28	621.71	450.78
	Intensidad (u arbitrarias)	16.91	32.6	23.23
Agregados	Área (μm^2)	11.96	15.38	29.12
	Intensidad (u arbitrarias)	96.51	98.73	110.66

Figura 36. Relación entre la señal IF de NSP2 difusa y la señal IF de NSP2 que forma agregados. El gráfico muestra la proporción de NSP2 que se encuentra de forma difusa así como la proporción de NSP2 que se encuentra formando agregados determinadas a partir de los datos del área y de la intensidad de NSP2 (mostrados en la tabla) en células BSC1 infectadas con SA11 por t PI. Se contabilizaron 20 células para cada tiempo por experimento y se muestran los promedios de tres experimentos independientes.

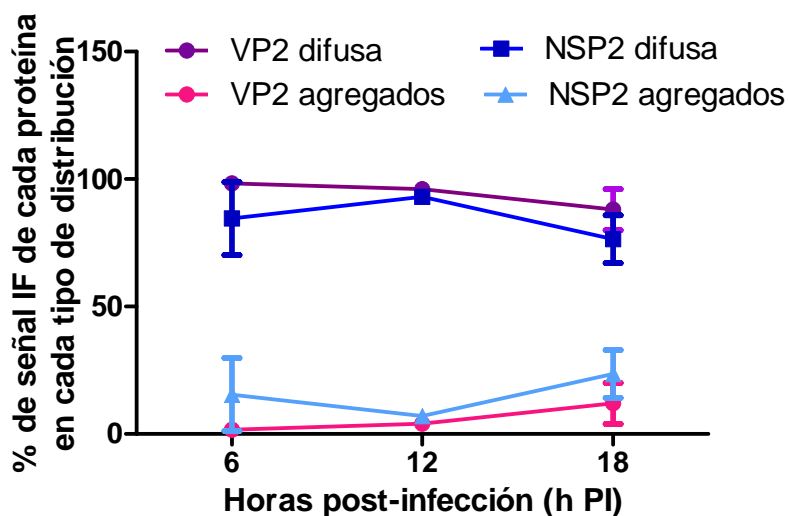


Figura 37. Comparación entre la señal IF de VP2 y de NSP2 difusa y la señal IF de ambas proteínas que forma agregados. El gráfico integra la proporción de VP2 y de NSP2 que se encuentra de forma difusa así como la proporción de éstas que se encuentra formando agregados determinadas a partir del área y de la intensidad de cada proteína a cada t PI. Se muestran los promedios de tres experimentos independientes.

A partir de los datos obtenidos es posible concluir que al igual que en el caso de VP2, la fracción mayoritaria de la proteína NSP2 se distribuye de manera difusa. Es de interés determinar el papel que juegan estas proteínas en el citosol. En la Figura 37 se muestra el conjunto de los datos de la proporción de VP2 y de NSP2 que se encuentra distribuida de forma difusa así como la proporción que forma agregados para facilitar la comparación.

- Descripción de la heterogeneidad de la infección viral.

Durante el análisis de la cinética de la distribución que sigue la proteína VP2 de rotavirus nos percatamos de que la infección viral es heterogénea. Es decir, a pesar de que inhibimos la entrada de partículas virales en tiempos posteriores a la primera h PI mediante el tratamiento con EGTA y el AMC 4F8, en todos los tiempos PI se observó gran variabilidad en los tamaños de los agregados de VP2 y de los viroplasmias (Figura

38). Del mismo modo, se observaron diferencias grandes en las intensidades de las señales de las proteínas VP2 y NSP2 en un mismo t PI (Figura 38).

Se ha reportado que los viroplasmata aumentan de tamaño conforme avanza la infección (Eichwald *et al.*, 2004), lo cual pudimos corroborar también durante el desarrollo de este trabajo (Figura 28). Sin embargo, es notable que el tamaño de los viroplasmata y de los agregados de VP2 es muy variable en cada t PI, pudiendo encontrar células con viroplasmata muy grandes así como células con viroplasmata todavía pequeños. Cabe resaltar que esto no es un fenómeno aislado o marginal sino que es bastante común, ya que aproximadamente el 50% de las células presentaron agregados en general más grandes o más pequeños.

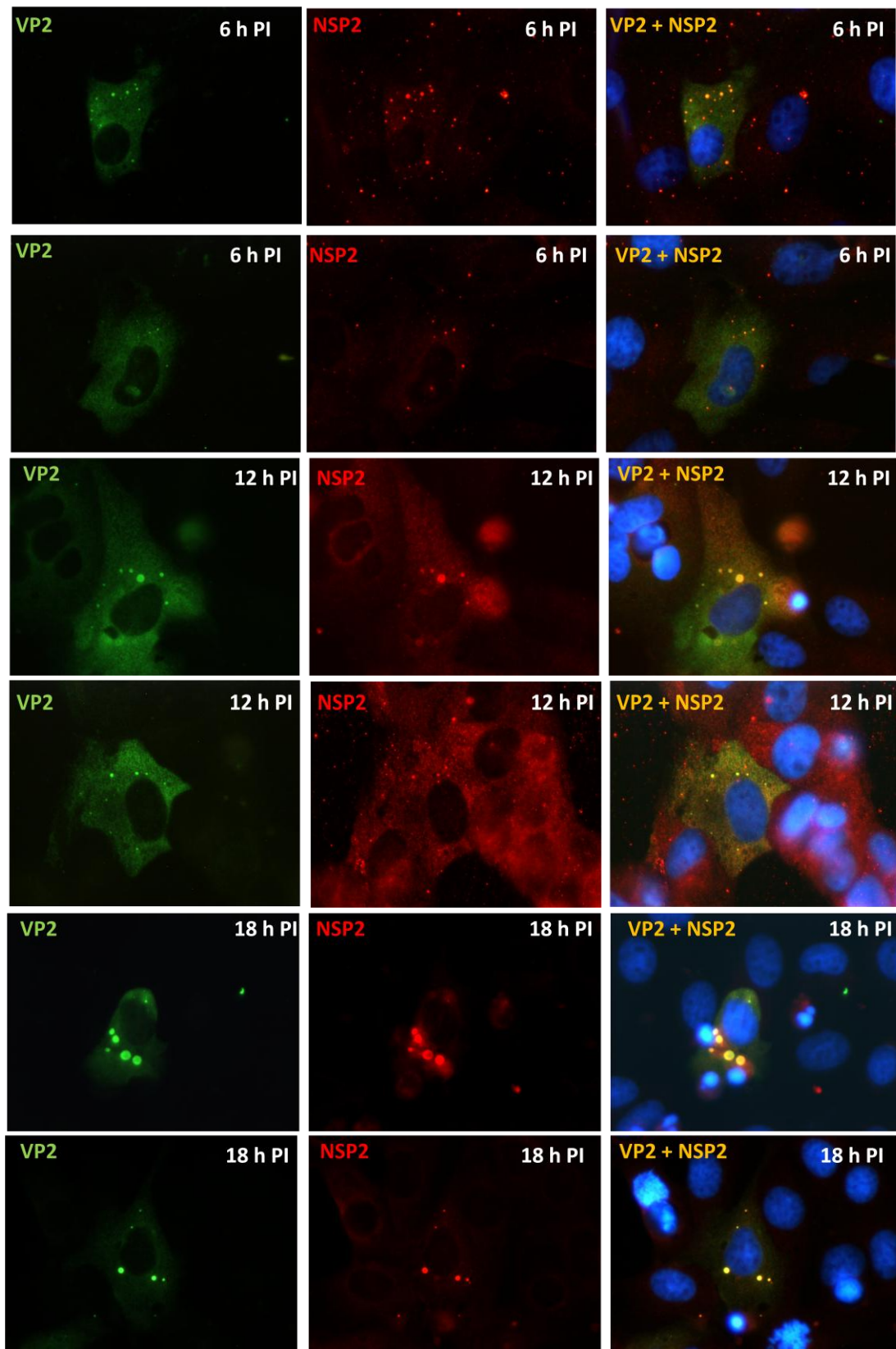


Figura 38. La infección por rotavirus es heterogénea. Células BS-C-1 infectadas por SA11 y fijadas a distintos tiempos PI. Las células fueron tratadas con EGTA y el AMC 4F8. Se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000) para visualizar a VP2 así como el suero anti-NSP2 6a (1:200) para visualizar a NSP2 (viroplasmos) por microscopía de epifluorescencia utilizando el objetivo 60X. Se muestra la variabilidad en los tamaños y en la intensidad de la señal de VP2 y de NSP2.

3) Expresión de VP2 en células MA-104 y BS-C-1 mediante un sistema del virus vaccinia recombinante.

Con el objetivo de conocer la distribución que tiene la proteína VP2 de rotavirus SA11 al ser expresada en células de mamífero en ausencia de otras proteínas virales se infectaron células MA-104 y BS-C-1 con el virus vaccinia recombinante vSA2 a una MOI de 2. Se fijaron las células a las 18 h PI de la forma descrita en la metodología. Se incubaron con el AMC anti-VP2 6E8/3A8 R4 de ratón en dilución 1:10,000 durante 1 hora a TA así como con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón Alexa 594 en dilución 1:200 durante 1 hora a TA.

Al analizar las células al microscopio de fluorescencia se observó que la distribución de VP2 en ambos tipos celulares cuando son infectados con vaccinia recombinante es difusa en todo el citoplasma (Figura 39). Desconocemos si en este compartimento existan “cores” de VP2 solamente discernibles por microscopía electrónica. Al analizar más detalladamente, se encontró que VP2 es también capaz de formar agregados en una proporción baja tanto en células MA-104 como en BS-C-1 (Figura 39). Estos resultados sugieren que VP2 no requiere de otras proteínas ni de RNA de rotavirus para autoagregarse. Sin embargo, al ser muy baja la proporción de agregados de VP2 que se forman mediante este sistema es posible que se trate de un artefacto y no de agregados auténticos, o que la capacidad de VP2 de autoagregarse sea una cuestión de eficiencia y que probablemente, al estar presentes otras proteínas del virus la proporción de agregados de VP2 aumente. Finalmente, es desconocido si la proteína VP2 es capaz de interactuar con componentes de la célula de forma directa o indirecta, facilitándose así la formación de agregados de dicha proteína.

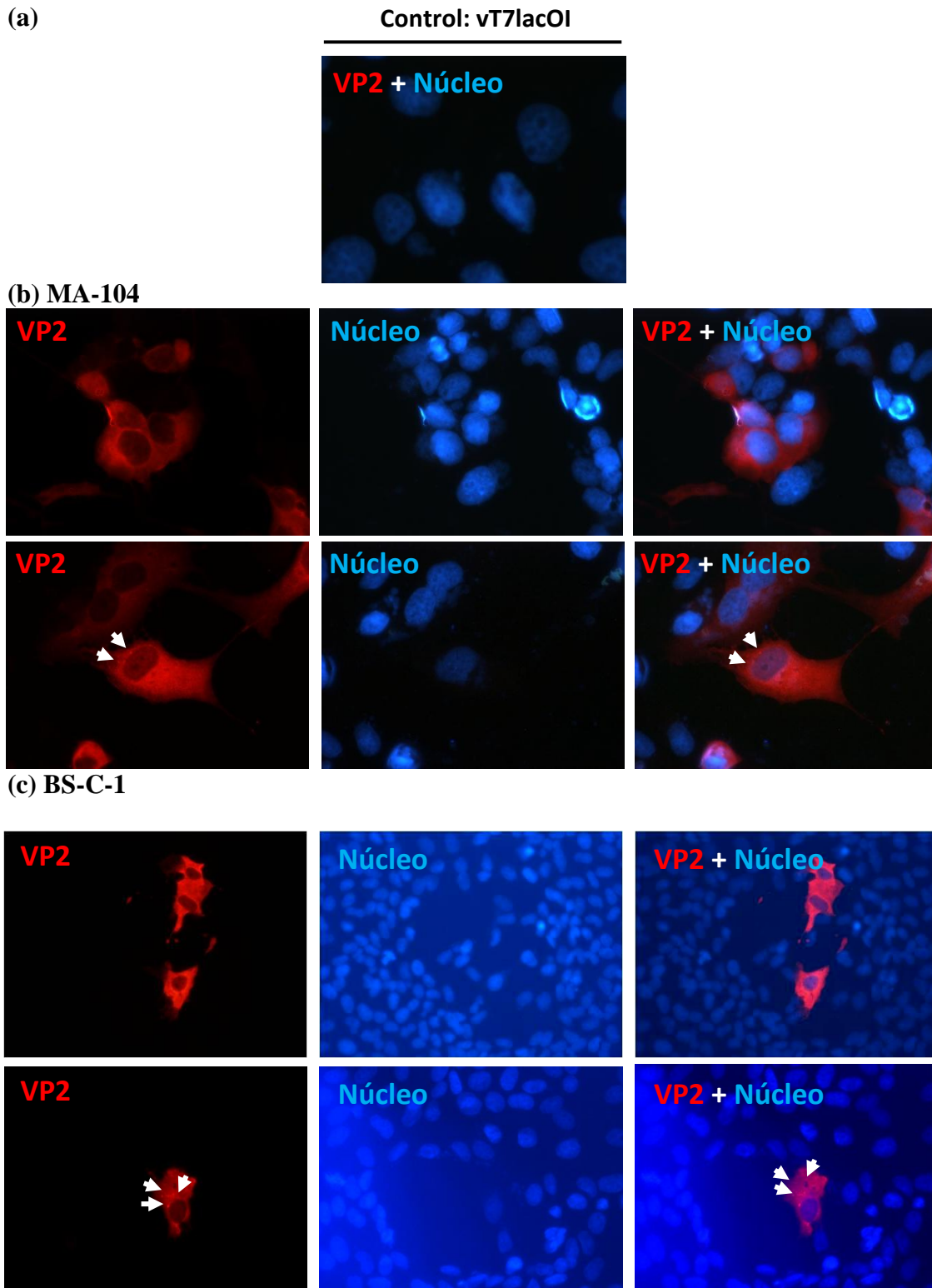


Figura 39. Expresión de VP2 mediante el sistema de vaccinia recombinante. Células BS-C-1 fueron infectadas por el vector vacío (virus vaccinia vT7lacOI) (a) o con el virus vaccinia vSA2 (b) y (c) y fijadas a las 18 h PI. En todos los casos se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000) para visualizar a VP2 por microscopía de epifluorescencia con el objetivo 60X. (b) Células MA-104, objetivo 40X. (c) Células BS-C-1, objetivo 20X. Las flechas blancas indican agregados de VP2.

4) Expresión de VP2, NSP2 y NSP5 en células BS-C-1 mediante un sistema híbrido del virus vaccinia.

Para determinar la distribución que sigue la proteína VP2 cuando es expresada en un sistema híbrido del virus vaccinia junto con otras proteínas como NSP2 y NSP5 se expresaron distintas combinaciones de estas proteínas en células de riñón de mono BS-C-1. Para esto, se utilizaron plásmidos que expresan a cada una de estas proteínas y que se encuentran bajo el promotor de la RNA polimerasa T7, por lo que las células fueron infectadas por el virus vaccinia vTF7-3, el cual dirige la expresión de la RNA polimerasa T7. A una h PI estas células se transfectaron con el plásmido pVOTE-VP2 para expresar a VP2, pVOTE-NSP2 para expresar a NSP2, pVOTE-NSP5 para expresar a NSP5, o con todas las combinaciones posibles entre ellos.

Se observó que al expresar a las proteínas VP2 o NSP2 solas, la distribución de NSP2 es difusa (Figura 40, panel izquierdo), no obstante se observó que VP2 al ser expresada sola, se distribuye casi siempre difusamente (Figura 40, panel medio), aunque también es capaz de formar agregados citosólicos en muy baja proporción (Figura 40, panel derecho).

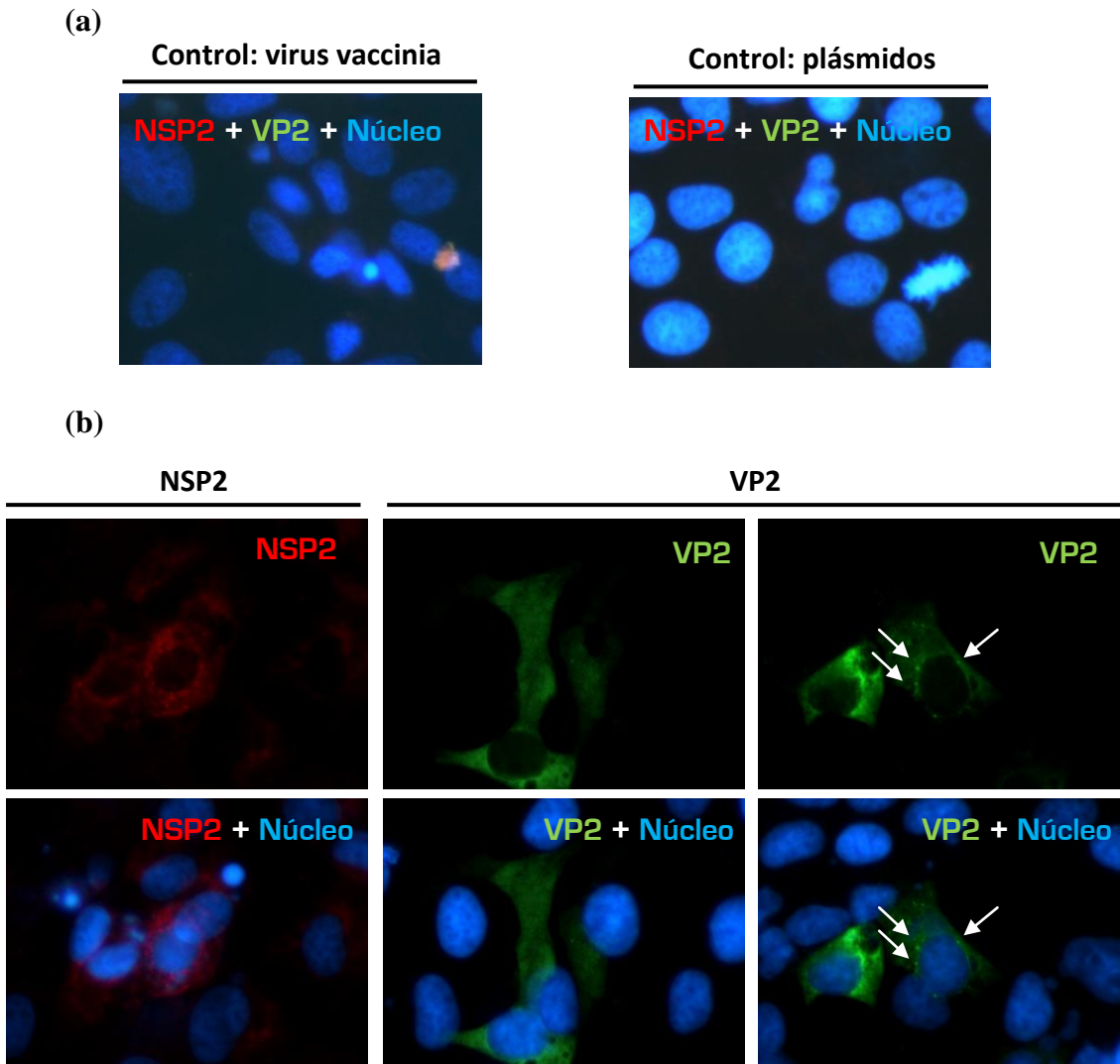


Figura 40. Expresión individual de VP2 y NSP2 mediante el sistema híbrido de vaccinia. (a) Controles: células BS-C-1 fueron infectadas por el virus vaccinia vTF7-3 (izquierda) ó transfectadas con los tres plásmidos (derecha), y en todos los casos se fijaron a las 20 h PI y se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000) para visualizar a VP2 así como el suero anti-NSP2 6a (1:200) para visualizar a NSP2 (viroplasmias) por microscopía de epifluorescencia utilizando el objetivo 60X. (b) Células BS-C-1 fueron infectadas por el virus vaccinia vTF7-3 y se transfectó el plásmido pVOTE-VP2 o el plásmido pVOTE-NSP2 en cada caso. Las células se fijaron a las 20 h PI. La proteína NSP2 presenta una distribución difusa, mientras que la proteína VP2 se distribuye de forma difusa o es capaz de formar agregados (panel derecho). Las flechas indican la presencia de agregados al expresar sólo a VP2.

Se expresaron las combinaciones de proteínas de rotavirus que se sabe son capaces de formar VLSs. Para este fin transfectamos células con los plásmidos de NSP2 y de NSP5 y así logramos apreciar la formación de VLSs. Este resultado confirma resultados anteriores de Fabretti *et al.*, 1999 (Figura 41).

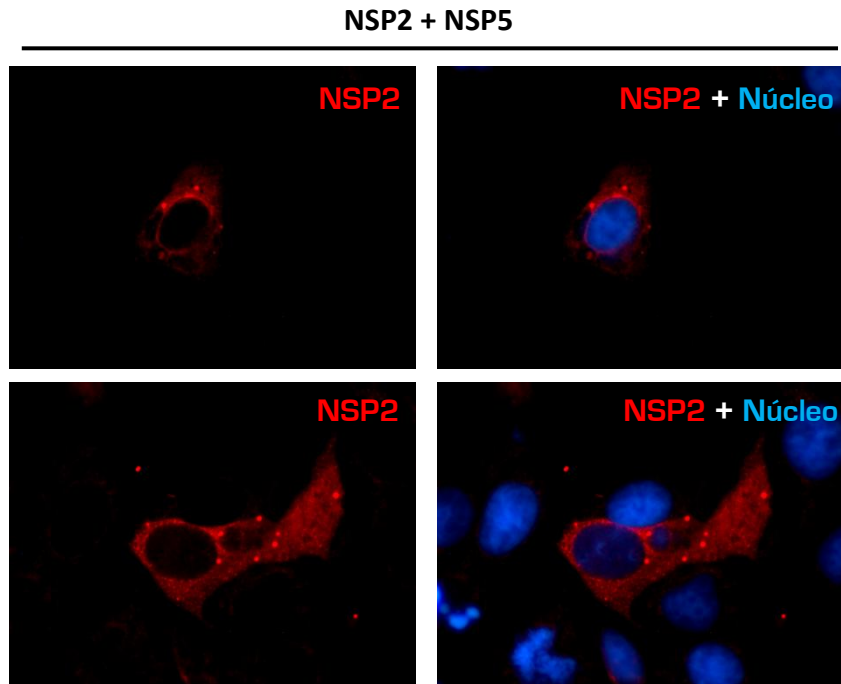


Figura 41. Coexpresión de NSP2 y NSP5 mediante el sistema híbrido de vaccinia. Células BS-C-1 fueron infectadas por el virus vaccinia vTF7-3 y se transfectaron con los plásmidos pVOTE-NSP2 y pVOTE-NSP5. Las células se fijaron a las 20 h PI. Se utilizó el suero anti-NSP2 6a (1:200) para visualizar a los VLSs por microscopía de epifluorescencia utilizando el objetivo 60X. No se utilizó un anticuerpo para visualizar a NSP5.

No obstante, cuando se realiza la expresión de NSP2 junto con la proteína VP2, la distribución de ambas proteínas sigue siendo difusa. Esto sugiere que no es suficiente con la proteína NSP2 para la formación de agregados citoplásmicos que contengan VP2 (Figura 42, arriba). Al coexpresar NSP5 y VP2 se observan agregados de VP2 que podrían o no contener a NSP5, sin embargo no fue posible definir esto último ya que no se cuenta con un buen anticuerpo contra NSP5 de rotavirus (Figura 42, abajo). Pensamos que los agregados de VP2 que se obtienen al coexpresar con NSP5 podrían contener a esta última proteína, ya que se observa una cantidad de agregados más alta que cuando se expresa a VP2 sola (Figura 40).

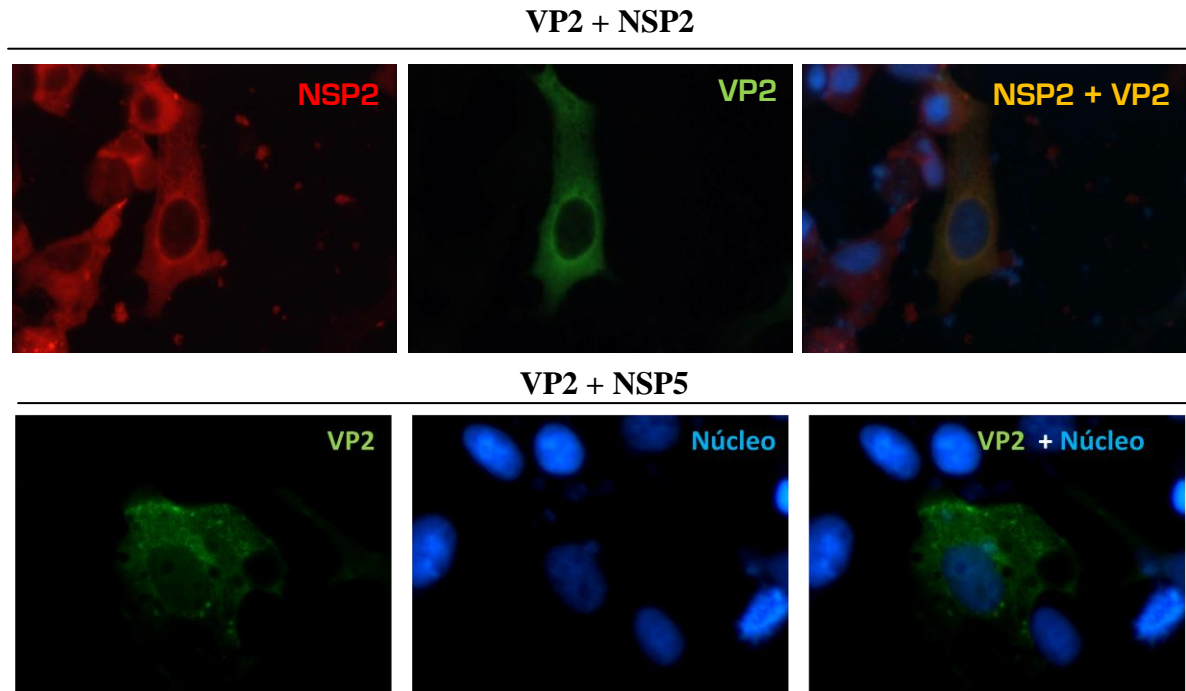


Figura 42. Coexpresión de VP2 y NSP2 o de VP2 y NSP5 mediante el sistema híbrido de vaccinia. Células BS-C-1 fueron infectadas por el virus vaccinia vTF7-3 y se transfectaron con los plásmidos p. VP2 y p.NSP2 o p.NSP5. Las células se fijaron a las 20 h PI. Se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000) para visualizar a VP2 así como el suero anti-NSP2 6a (1:200) para visualizar a NSP2 por microscopía de epifluorescencia utilizando el objetivo 60X. No se utilizó un anticuerpo para visualizar a NSP5. Se observa que la expresión de VP2 y NSP2 no es suficiente para la formación de agregados que contengan ambas proteínas. Durante la expresión de VP2 y NSP5 se observan agregados de VP2 de los cuales se desconoce si contienen también a NSP5.

Cuando se realiza la expresión de las tres proteínas NSP2, NSP5 y VP2 es posible observar que VP2 colocaliza con los VLSs (Figura 43 y 44). Aunado a esto encontramos, al igual que en células infectadas por rotavirus, que existen zonas en el citosol de algunas células que carecen de señal de la proteína VP2 y que coinciden perfectamente con agregados formados por NSP2 (Figura 43). Estos agregados podrían representar VLSs que no lograron reclutar a la proteína VP2.

Se tomaron fotografías de microscopía confocal las cuales permitieron corroborar la colocalización de VP2 con los VLSs determinados a partir de NSP2, en distintos planos (Figura 44). Se obtuvieron planos cada 1 μm utilizando la función del microscopio confocal Olympus FV1000.

VP2 + NSP2 + NSP5

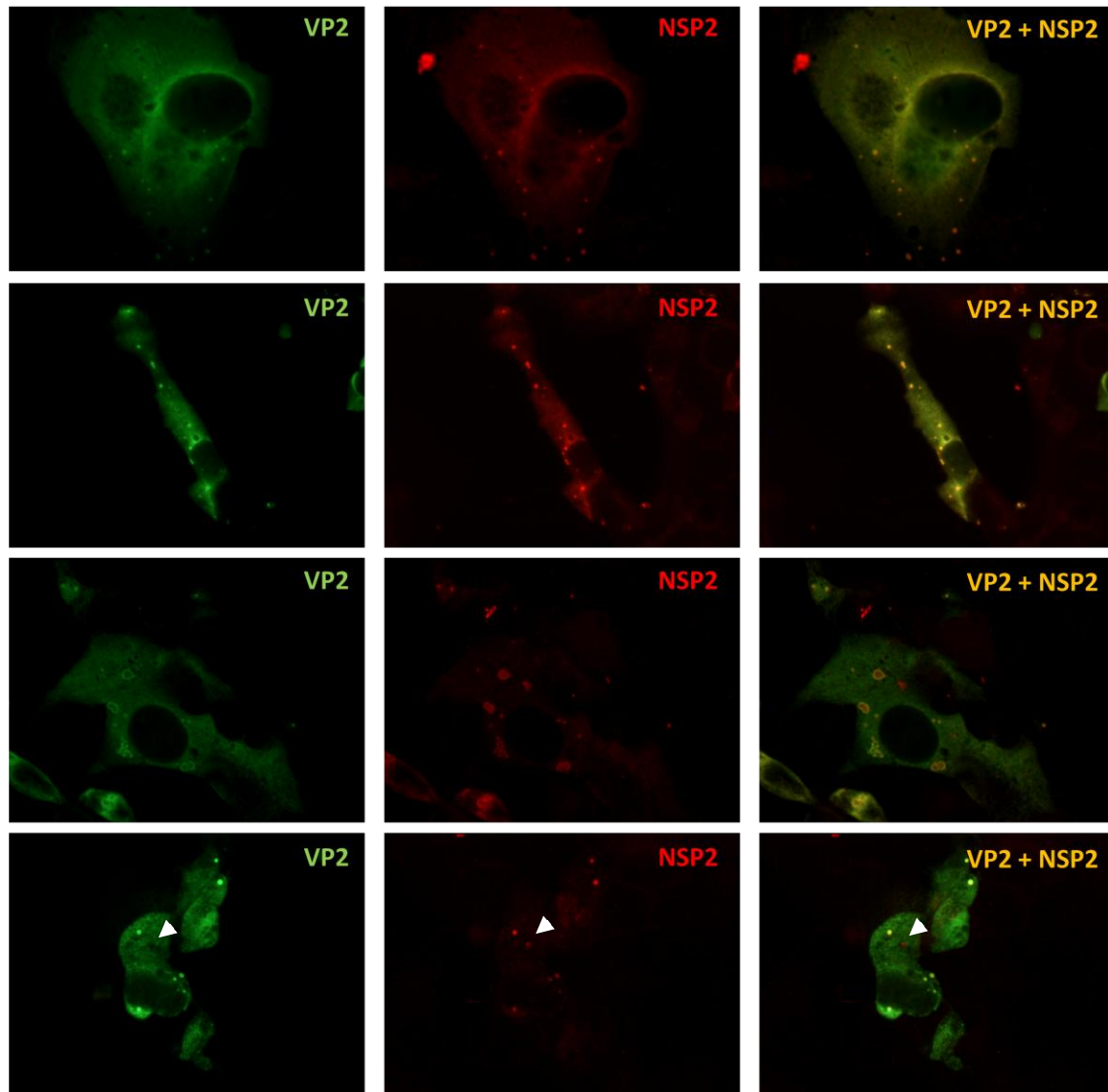


Figura 43. Coexpresión de VP2, NSP2 y NSP5 mediante el sistema híbrido de vaccinia. Células BS-C-1 fueron infectadas por el virus vaccinia vTF7-3 y se transfectaron con los plásmidos p.VP2, p.NSP2 y p.NSP5. Las células se fijaron a las 20 h PI. Se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000) para visualizar a VP2 así como el suero anti-NSP2 6a (1:200) para visualizar a los VLSs por microscopía de epifluorescencia utilizando el objetivo 60X. En las fotografías se observa que se forman VLSs en los cuales se encuentra también la proteína VP2. La flecha blanca indica una zona del citosol en donde no está presente VP2 pero sí NSP2.

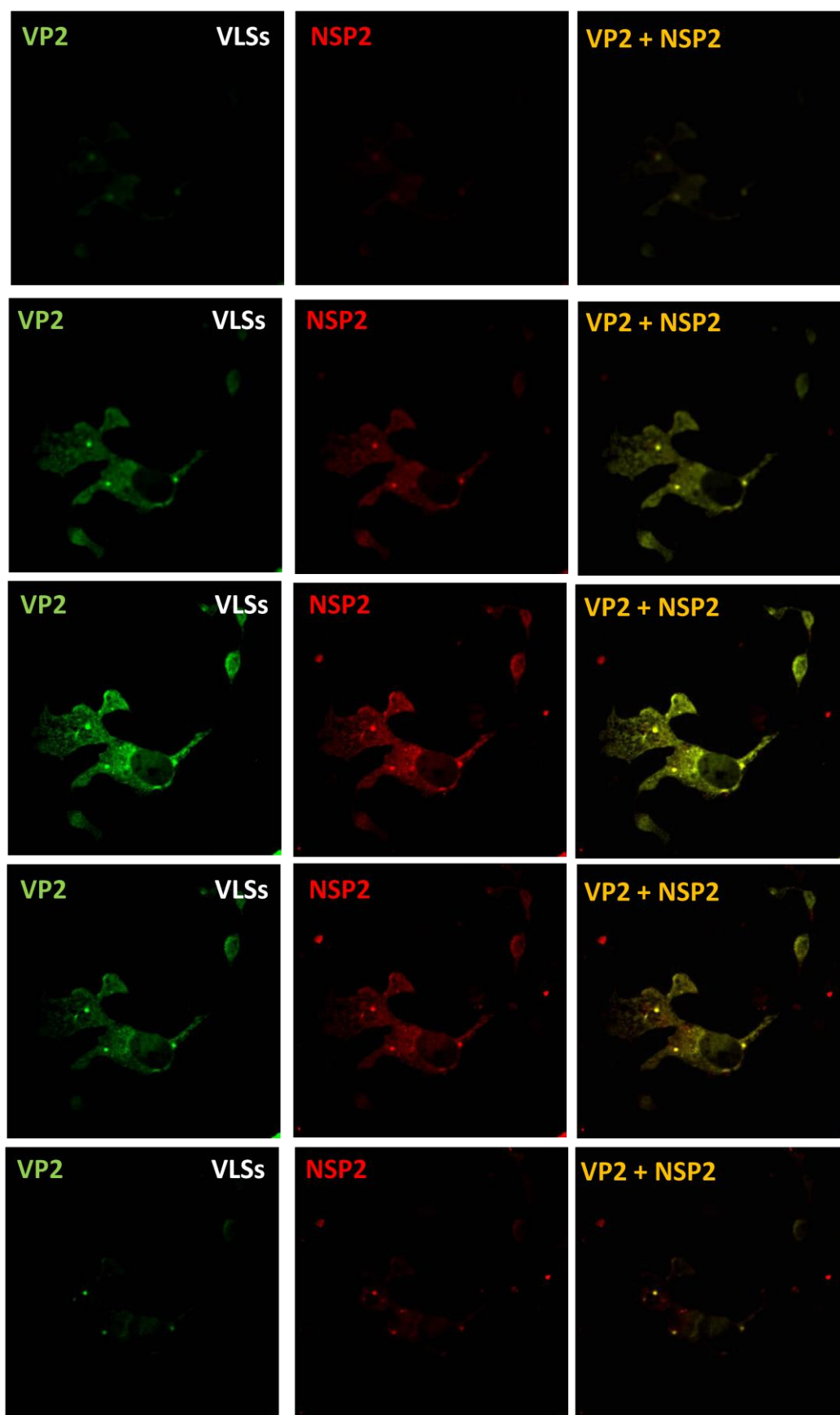


Figura 44. Microscopía confocal de los VLSs formados por la coexpresión de VP2, NSP2 y NSP5. Células BS-C-1 fueron infectadas por el virus vaccinia vTF7-3 y se transfectaron con los plásmidos p. VP2, p.NSP2 y p.NSP5. Las células se fijaron a las 20 h PI. Se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8 (1:10,000) para visualizar a VP2 así como el suero anti-NSP2 6a (1:200) para visualizar a los VLSs por la técnica de inmunofluorescencia confocal. Se muestran fotografías de microscopía confocal en donde es posible apreciar que VP2 colocaliza con los VLSs en todos los planos obtenidos. Las imágenes se obtuvieron en intervalos de 1 μm utilizando la función de Z del microscopio confocal Olympus FV1000.

- Eficiencia de reclutamiento de VP2 en las VLSs

Con el objetivo de analizar la eficiencia de reclutamiento de VP2 en las VLSs se utilizaron dos procedimientos. Por un lado se contó el número VLSs por célula así como el número de agregados de VP2 que se localizan en los VLSs y a partir de estos datos se obtuvo una relación que correspondía a la fracción de VLSs que reclutan a VP2, la cual resultó ser de 0.66 (Figura 45). Por lo tanto, podemos concluir que los VLSs (NSP2 y NSP5) son suficientes para lograr el reclutamiento de VP2, ya que no se requieren otras proteínas virales ni RNAm viral para que ocurra este fenómeno.

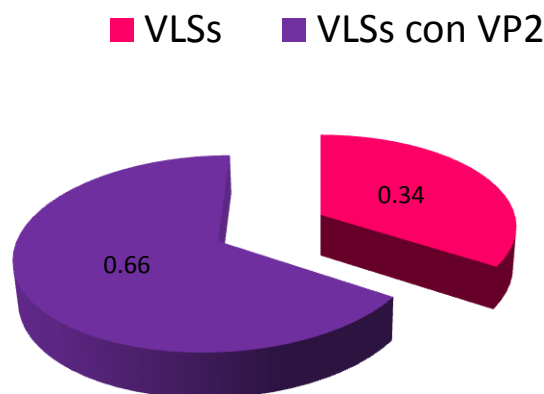
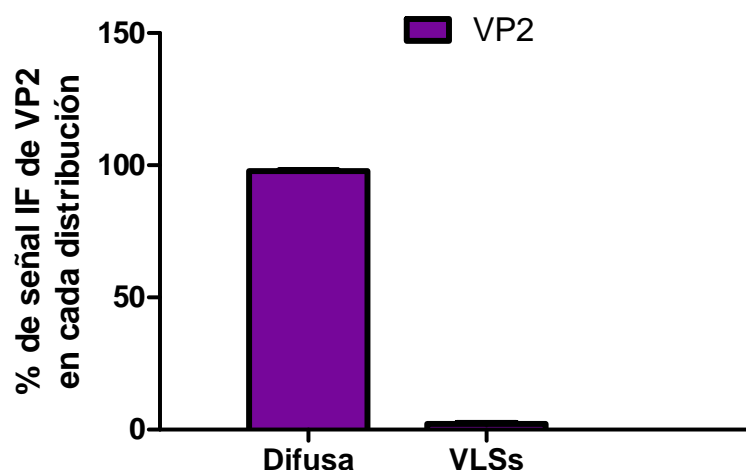


Figura 45. La fracción de VLSs que recluta a VP2 es alta. Se contabilizó el número de células que presentan VLSs, así como el número de éstos VLSs que presentan también a VP2 y se obtuvo que el 66% de los VLSs reclutaron a VP2. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes.

El segundo procedimiento utilizado para describir la eficiencia de reclutamiento de VP2 en los VLSs consistió en mediar la señal IF de VP2 que se encuentra formando parte de los VLSs por célula y compararla con la señal IF de VP2 que se encuentra de forma difusa por célula. Se utilizaron herramientas del software Image-Pro Plus v. 6.2, las cuales nos permitieron determinar la superficie de la célula en la cual VP2 se encuentra de forma difusa así como el área total de los agregados de VP2 que forman parte de los VLSs en cada t PI. Del mismo modo, se obtuvo la intensidad promedio de la señal difusa así como la intensidad de la señal de los agregados. A partir de multiplicar los datos de área y de intensidad de la señal se calculó la cantidad de proteína VP2 difusa y la cantidad de proteína VP2 que forma parte de los VLSs (ver metodología). Se encontró que sólo un 2.24 % de proteína VP2 se encuentra acumulada en los VLSs por célula (Figura 46).



Señal IF de VP2		
Difusa	Área (μm^2)	856.99
	Intensidad (u arbitrarias)	40.74
VLSs	Área (μm^2)	7.24
	Intensidad (u arbitrarias)	109.17

Figura 46. Relación entre la señal IF de VP2 que forma los VLSs y la señal IF de VP2 difusa. El gráfico muestra la proporción de VP2 que se encuentra de forma difusa así como la proporción de VP2 que se encuentra reclutada en VLSs determinadas a partir de los datos del área y de la intensidad de VP2 (mostrados en la tabla) en células BS-C-1 infectadas por vTF7-3 y transfectadas con los plásmidos pVP2, p.NSP2 y p.NSP5. Se contabilizaron 10 células que presentaban a VP2 difusa y formando VLSs por experimento. Se muestran los promedios de tres experimentos independientes.

XI. Discusión

La inquietud de llevar a cabo un estudio detallado de la cinética de la localización intracelular de la proteína VP2 de rotavirus nace del hecho que tan sólo se contaba con estudios realizados a un solo tiempo post-infección. Asimismo, se conoce poco acerca de las funciones de esta proteína durante el ciclo replicativo viral. Dichos estudios no permitían apreciar con exactitud la dinámica de la localización subcelular de VP2 y, por lo tanto, otras posibles funciones de esta proteína, alternativas a la de formar parte de los viroplasmos, y a la de ser parte de complejos de replicación viral, no eran siquiera consideradas.

Para el desarrollo de este estudio se utilizó el AMC anti-VP2 6E8/3A8, el cual resultó ser excelente para llevar a cabo técnicas como la inmunofluorescencia, ya que permite un amplio intervalo de diluciones (1:200 → 1:128,000) y de esta forma facilita el análisis de la proteína VP2 en condiciones en las cuales su expresión es muy baja y por lo tanto también su señal. En el caso de infecciones por rotavirus o de la expresión de VP2 a través de sistemas del virus vaccinia, los niveles de expresión de VP2 fueron bastante altos como para permitirnos utilizar una dilución alta del anticuerpo (1:10,000) y aun así obtener una excelente señal de dicha proteína.

Es de interés resaltar la importancia de inhibir la entrada de partículas virales en diferentes tiempos posteriores al de interés para varios tipos de estudios, ya que de ello depende el tener resultados confiables que reflejen con autenticidad lo que sucede en la célula durante la infección por rotavirus. Tradicionalmente, en los estudios que se hacen con rotavirus no es frecuente que se sincronice la infección, lo cual podría estar conduciendo a dificultad en la interpretación de los resultados. Para efectos de la inhibición de la entrada de partículas virales a la célula a distintos tiempos algunos grupos utilizan el agente quelante etilen-glicol ácido tetracético (EGTA) a muy bajas concentraciones (Ayala-Breton *et al.*, 2009). El EGTA quela cationes divalentes como el Ca^{2+} y uno puede tomar ventaja de esto ya que el rotavirus requiere del Ca^{2+} para la estabilidad de su capa más externa, formada por VP4 y VP7, sin la cual la partícula viral no es infecciosa (Dormitzer y Greenberg, 1992). No obstante, el EGTA tiene también como efecto el desprendimiento de la monocapa celular por lo que bajas concentraciones de EGTA así como tratamientos cortos (de segundos a unos pocos minutos) son recomendados. Una alternativa más efectiva que el EGTA la constituye el

uso de anticuerpos neutralizantes seleccionados específicamente para unirse a proteínas de la capa externa del virus y de esta forma interferir con la internalización del virus a la célula. En el presente estudio se utilizó el AMC 4F8, que fue producido usando RRV como antígeno, y el cual neutraliza con títulos idénticos a las cepas SA11 y RRV (Shaw *et al.*, 1985). Mientras que algunos AMC evitan la unión del virus a la célula, se ha sugerido que el AMC 4F8 interfiere con un paso posterior a la unión virus-célula, es decir, estaría evitando la penetración viral. Se ha reportado que el AMC 4F8 está dirigido contra VP7 y, a una concentración de 20 µg/ml, neutraliza al virus RRV pre-adsorbido a las células con un 99% de efectividad (Ruggeri y Greenberg, 1991). Aparentemente, al utilizar una dilución del AMC 4F8 1:200 (5-50 µg/ml de IgG's) contábamos con una cantidad apropiada de IgG para neutralizar casi completamente a los virus. No obstante, encontramos que el AMC 4F8 a una dilución 1:200 logró reducir la infectividad del virus SA11 pre-adsorbido a las células con una eficiencia de 95%, lo cual sigue representando un intervalo confiable para la realización de los ensayos que aquí se requerían, aunque esta eficiencia no alcanzara a la previamente reportada (Ruggeri y Greenberg, 1991). Creemos que el hecho de no haber encontrado una neutralización del 99% de partículas virales se debe a errores experimentales tales como variaciones menores en la temperatura de incubación, la cual debe ser mantenida en todo momento a 4 °C. Al estudiar el efecto combinado del EGTA y el AMC 4F8 como método para inhibir la entrada de partículas virales en tiempos posteriores al periodo de adsorción e internalización (1 h PI) encontramos que del 100% de virus que entra a la célula cuando no se trata con EGTA y el AMC 4F8, y tan sólo se remueve el virus no adsorbido mediante lavados, un poco más del 70% corresponde a partículas virales que entran en tiempos posteriores al tiempo normalmente usado para adsorción y penetración que es de 1 hora a 37 °C.

En infecciones tratadas o no con EGTA y el AMC 4F8 encontramos dos patrones de distribución para la proteína VP2, “difusa” y “difusa más agregados”. En experimentos posteriores encontramos que los agregados de VP2 en células MA-104 y BS-C-1 infectadas por rotavirus corresponden casi siempre a viroplasmias (colocalizan con NSP2, la cual es el marcador de dichas estructuras) confirmando así los resultados de Petrie *et al.* (1982).

Al estudiar las proporciones de células que contenían a la proteína VP2 distribuida de manera difusa contra las proporciones de células que contenían a la proteína VP2

distribuida de la forma difusa más agregados con y sin el tratamiento de EGTA y AMC 4F8 encontramos diferencias sustanciales. Cuando estudiamos los patrones de distribución de VP2 en células BS-C-1 infectadas por SA11 sin utilizar el EGTA y el AMC 4F8, encontramos que en tiempos tempranos existía una alta proporción (mayor al 60%) de células con VP2 distribuida de forma difusa y que dicha proporción disminuía a medida que avanzaba la infección, de tal forma que en tiempos tardíos se mantenía en niveles cercanos al 30%. Inicialmente pensamos que en células con infecciones tempranas, VP2 se distribuye de forma difusa para posteriormente irse acumulando en agregados citosólicos y que debido a ciclos de reinfecciones, encontrábamos células con VP2 distribuida de forma difusa aún en tiempos tardíos. Sin embargo, cuando se volvieron a analizar los patrones de distribución de VP2, esta vez tratando con EGTA y con el AMC 4F8, encontramos sorprendentemente, que la proporción de células en las que VP2 se encontraba distribuida de forma difusa era mínima aún en tiempos muy tempranos (6 h PI), ya que dicha proporción pasó de ser mayor al 60% (en infecciones no tratadas con EGTA y el AMC 4F8) a ser menor al 2% (en infecciones tratadas con EGTA y el AMC 4F8). Estos resultados hacen reconsiderar la hipótesis de que células con la proteína VP2 difusa representan infecciones virales tempranas, más aún si tomamos en cuenta que en t PI tempranos la proporción de células con VP2 difusa fue más baja que en t PI tardíos al utilizar el EGTA y el AMC 4F8. Asimismo no se encontró a VP2 distribuida de forma difusa en tiempos más tempranos a las 6 h PI. Aunado a esto encontramos que cuando la proteína VP2 se encuentra de forma difusa, los viroplasmos medidos a partir de la proteína NSP2, presentan una morfología alterada, fenómeno que no se observa cuando la proteína VP2 forma agregados en el citosol.

La eficiencia de plaqueo de virus animales generalmente es menor a 0.01, esto quiere decir que de cada 100 partículas virales, 1 es infecciosa pero 99 no lo son, sin embargo, la eficiencia de plaqueo de rotavirus aislados de heces de humano en cultivo de células MA104 es de 1 partícula en 6,600 (Ward *et al.*, 1984). Considerando que NSP2 es el marcador de la forma de los viroplasmos, que la replicación viral ocurre en dichas estructuras y que ensayos de RNA de interferencia contra NSP2 y contra NSP5 resultan en el bloqueo de la replicación viral (Estes, 2001; Campagna *et al.*, 2005; López *et al.*, 2005), podemos establecer la hipótesis de que alteraciones en la

morfología, tamaño y número de los viroplasmos como las que se observan cuando VP2 se encuentra difusa conducirían a alteraciones en la replicación viral.

Pensamos que estos defectos en la replicación se deben a la coinfección de las células por partículas DI y silvestres y a la subsecuente interferencia entre ellas. Así, si la infección por partículas defectivas interfiere con la infección por virus silvestre, esto conduciría a defectos en la replicación, lo cual se manifestaría como alteraciones en la morfología de los viroplasmos y en la distribución de VP2 y finalmente, a infecciones no exitosas o aberrantes. De esta forma, la proteína VP2 distribuida de manera difusa estaría fungiendo como un marcador de infecciones aberrantes.

Es sabido que al infectar con multiplicidades de infección mayores se incrementa la probabilidad de que más de una partícula viral penetre una misma célula y por consiguiente, la probabilidad de que partículas DI entren junto con las silvestres aumenta. Con el fin de explorar la hipótesis propuesta, infectamos células con distintas multiplicidades de infección y cuantificamos la predominancia del fenotipo difuso de la proteína VP2. Encontramos que efectivamente, al infectar con MOIs más altas, se incrementa la proporción de células con VP2 distribuida de forma difusa. Estos resultados sugieren que aquellas células en las que VP2 se distribuye de forma difusa derivan de coinfecciones por partículas DI y silvestres, lo cual conduciría al fenómeno de interferencia de las partículas defectivas sobre las silvestres; dicho de otra manera, existe competencia entre ambas y ésta siempre culmina con el éxito de las partículas DI. Asimismo, podrían ocurrir infecciones mediadas sólo por partículas DI. Proponemos que la distribución difusa de VP2 es un marcador de infecciones aberrantes y que gran cantidad de éstas se deben a defectos en la replicación (infecciones por DI) así como al efecto combinatorio de una dosis mayor de partículas virales internalizadas. A la fecha, se desconoce cuál es el mecanismo por el cual las partículas DI de rotavirus interfieren con las partículas virales silvestres. Estudios de los mecanismos de interferencia podrían dar detalles importantes sobre la replicación de rotavirus, así como sobre las interacciones entre el virus y el hospedero. Asimismo, algunos virus DI tienen efectos moduladores en las enfermedades que originan por lo que el estudio de éstos podría brindar conocimiento relevante para combatirlos. No obstante, no podemos descartar que las infecciones no productivas de rotavirus sean el resultado de otro tipo de fenómeno tal como la etapa del ciclo celular en la cual el virus penetra a la célula, la cual no podría ser la más óptima para desarrollar una infección exitosa.

Definitivamente, se requieren de otro tipo de estudios para esclarecer con mayor exactitud este punto.

Estudiando un poco más a fondo la distribución de VP2 denominada difusa más agregados encontramos que la fracción de VP2 que se encuentra de manera difusa es muy alta comparada con la fracción de VP2 que forma agregados. Como se ha venido mencionando a lo largo de este trabajo, tradicionalmente se ha sugerido que VP2 es una proteína más de los viroplasmata en los cuales tiene funciones relacionadas con la replicación viral (Petrie *et al.*, 1982). Nuestros datos de microscopía confocal permitieron corroborar que la fracción de VP2 que forma agregados efectivamente se encuentra ubicada en los viroplasmata. Nuestros resultados concuerdan con los datos reportados por otros grupos (Petrie *et al.*, 1982), pero no con los datos reportados por González *et al.* (2000). Ellos utilizaron la cepa YM para infectar células MA-104 y observaron por microscopía confocal que una buena fracción de los agregados de VP2 no colocaliza con los viroplasmata. Nosotros no encontramos dicho fenotipo en ninguna de las células BS-C-1 infectadas por SA11 y pensando que tal vez pudieran existir diferencias entre cepas y/o entre tipos celulares como comúnmente sucede, realizamos infecciones de células MA-104 por rotavirus YM y las analizamos por inmunofluorescencia (datos no mostrados), no pudiendo encontrar el fenotipo reportado por González *et al.*, (2000). Desconocemos la razón de las diferencias entre nuestros resultados y lo reportado por González *et al.*, (2000).

Hasta la fecha, no existen estudios de la fracción citosólica de VP2 y no se ha considerado una posible función de VP2 en el citosol. En este trabajo encontramos que la fracción mayoritaria de VP2 se encuentra de forma difusa en el citosol. Del mismo modo, la fracción mayoritaria de la proteína NSP2 se distribuye en el citoplasma. Es de interés el hecho de que la mayor parte de la proteína VP2 producida no se llegue a incorporar a viroplasmata. Del mismo modo, si consideramos que se ha propuesto que el ciclo replicativo viral tiene una duración aproximada de 12 horas, y que en tiempos posteriores a éste, el número de unidades infecciosas formadas es muy bajo y, finalmente, que encontramos que a las 18 h PI la cantidad de VP2 que se ubica en viroplasmata es creciente aunque la mayor parte de la proteína VP2 no logra acumularse nunca a los viroplasmata, podemos sugerir que el proceso de infección por rotavirus es ineficiente.

Alternativamente, es bien sabido que las proteínas de virus suelen ser multifuncionales, particularmente en virus cuyos genomas son pequeños, por lo tanto, la presencia de VP2 en el citosol podría hablarnos de funciones importantes de dicha proteína para la replicación viral que no son evidentes. En estudios recientes de Ayala-Bretón *et al.*, (2006) se encontró que VP2 incrementa la vida media de los mensajeros virales, por lo que la función citosólica de VP2 podría ser específicamente la de aumentar la vida media de éstos. Por otra parte, es posible que la señal difusa de VP2 corresponda a partículas virales diseminadas en la célula y no a proteína que no logró incorporarse a los viroplasmatas. Otros estudios podrían dilucidar el rol de estas proteínas en el citosol y/o compartimentos subcelulares.

En nuestros resultados encontramos además que una muy pequeña fracción de VP2 se encuentra formando pequeños agregados de un tamaño constante que no colocan con los viroplasmatas. Dichos agregados no se encontraron en todas las células, lo cual podría deberse a dificultades en su identificación debido a su tamaño tan pequeño o a que simplemente no se forman en todas las células infectadas por rotavirus. Las mediciones de la distancia de dichos agregados a los viroplasmatas reflejan que existe una distancia relativamente constante entre ellos a distintos tiempos PI, por lo que no parecen estar en tránsito hacia los viroplasmatas y parecería más bien que mantienen una distribución diferente a éstos. Sin embargo, el conocer si dichos agregados en verdad se están dirigiendo a viroplasmatas o no, pudiera resultar mucho más complejo y por lo tanto, requerir de otro tipo de estudios. Pensamos que los agregados minoritarios de VP2 podrían representar estructuras con virus ya ensambladas o alternativamente, corresponder a zonas en el citoplasma en las que VP2 se autoensambla para formar “cores” vacíos. Se sabe que las infecciones por rotavirus producen “cores” vacíos, y se han visualizado estas estructuras por microscopía electrónica al expresar a VP2 sola en células de mamífero (Pourasgari *et al.*, 2007) o de insecto (Labbé *et al.*, 1991)

Por otro lado encontramos que en t PI tardíos, existen agregados de NSP2 que carecen de VP2. El mismo fenómeno se observó al coexpresar a las tres proteínas virales: VP2, NSP2 y NSP5. Esto sugiere que en infecciones por rotavirus existen errores que conducen a la formación de estructuras aberrantes diferentes a los viroplasmatas auténticos. Es decir, viroplasmatas mal formados carentes de componentes básicos como es la proteína VP2. Este fenómeno ocurre con baja frecuencia en células infectadas por rotavirus y representaría otro tipo de proceso aberrante durante la

infección viral. No obstante, este fenómeno podría no tener gran impacto sobre la replicación del virus, debido a que sólo se observó a las 18 h PI, tiempo en el cual se cree que ya ha terminado el ciclo replicativo viral.

Finalmente, durante la cinética de la infección por rotavirus encontramos que ésta es heterogénea. Es decir, a pesar de haber utilizado el EGTA y el AMC 4F8 para inhibir la entrada de partículas virales a la célula en distintos tiempos, existe gran variabilidad en el tamaño de los agregados formados por VP2 y por NSP2 en un mismo t PI así como en la intensidad de las señales de cada una de estas proteínas, lo cual es un reflejo de la expresión de las mismas. Por lo anterior podemos inferir que existen condiciones intracelulares variables que resultan en heterogeneidad de la morfología de los viroplasmos. Es conocido que existe variabilidad en la progresión del ciclo replicativo de otros virus animales (Miller *et al.*, 2007; Niller *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009). Sin embargo, se desconoce si la variabilidad de la infección por rotavirus depende de la etapa del ciclo celular en la que se encuentra la célula al momento de la infección o de otras condiciones. Una forma de abordar lo primero sería sincronizando a todas las células en la fase G₀ del ciclo celular previo a la infección, lo cual se puede lograr incubando a las células con medio sin suero fetal bovino.

Al expresar a la proteína VP2 en dos sistemas de vaccinia, se observó que dicha proteína tiene una distribución difusa aunque en una muy baja proporción es también capaz de autoensamblarse en agregados citosólicos similares a lo que se ha reportado al expresar a VP2 en células de insecto mediante el sistema de baculovirus (Berois *et al.*, 2003). Al parecer, para la formación de dichos agregados, VP2 no requiere de otras proteínas de rotavirus ni del RNA viral. Se desconoce si VP2 es capaz de interactuar con componentes de la célula y por lo tanto, si requiere de alguno de ellos para agregarse. Es posible que este fenómeno no represente más que un artefacto o que para lograr una mayor eficiencia en la autoagregación de VP2 se requieran de otros componentes virales y/o celulares que interactúen directa o indirectamente con esta proteína. Sería interesante determinar si en estos agregados citosólicos representan sitios donde se ensamblan “cores” de VP2 que se forman en células de mamífero al expresar a VP2 recombinante (Pourasgari *et al.*, 2007). Si esta hipótesis es cierta, se espera que la fracción de VP2 que forme “cores” sea muy baja, como ocurre con la frecuencia de formación de agregados.

En cuanto a la serie de eventos que caracterizan la replicación viral, encontramos que la expresión de NSP2 mediante el sistema híbrido de vaccinia conduce a una distribución difusa de dicha proteína que no logra condensarse en agregados citosólicos, del mismo modo, durante la coexpresión de VP2 y de NSP2 se encontró un patrón de distribución difuso para ambas proteínas y no se observó a VP2 en agregados. Es desconocido para nosotros si la razón por la cual no se observó a VP2 en agregados se deba a que éste es un fenómeno raro o poco eficiente y por lo tanto difícil de encontrar o que NSP2 esté interfiriendo de alguna forma con la capacidad de VP2 de autoagregarse. Sin embargo, no se ha reportado que VP2 sea capaz de interactuar con NSP2, por lo que esta última explicación parece ser menos probable. Al coexpresar a VP2 y a NSP5 sí se observaron agregados de VP2 aunque no fue posible saber si dichos agregados contenían también a la proteína NSP5 o si dicha célula estaba expresando a esta proteína debido a que no se cuenta con un buen anticuerpo contra esta última.

Sin embargo resultados recientes de Contin *et al.* (2010) demuestran que es suficiente con la expresión de NSP5 o de VP2 y NSP5 para la formación de VLSs que contienen a ambas proteínas. Finalmente nosotros coexpresamos a las dos proteínas que son consideradas como esenciales para la formación de los viroplasmos: NSP2 y NSP5 junto con VP2 y encontramos que se forman VLSs (medidos a partir de la proteína NSP2), los cuales contienen también a la proteína VP2. Encontramos que el 66% de las células que forman VLSs poseen también a VP2 y que la eficiencia de formación de estos agregados es de 2.24% lo cual refleja que este sistema de expresión es noble para la realización de este tipo de ensayos. Nuestros resultados confirman lo encontrado por Contin *et al.* (2010), con la diferencia de que nosotros tan sólo pudimos concluir que los VLSs medidos a partir de NSP2 son capaces de reclutar a VP2, mientras que ellos encontraron también que la sola expresión de NSP5 y de VP2 conduce a la formación de VLSs. No obstante, no se ha determinado aún si los VLSs formados por NSP5 y VP2 constituyen estructuras auténticas y/o funcionales, pero podría ser dilucidado al transfectar también RNA mensajero de rotavirus y observar si es reclutado por dichos VLSs o si es necesario que esté presente también NSP2 para lograr el reclutamiento o, en última instancia, si no es suficiente con la presencia de estas tres proteínas virales para reclutar a RNA mensajero de rotavirus, lo cual significaría que dichas estructuras no son funcionales. El hecho de que NSP5 interactúe con VP2 (Berois *et al.*, 2003) y más aún, que la sola expresión de VP2 y NSP5 conduce a la formación de VLSs (Contin

et al., 2010), podría tener implicaciones para el orden de eventos sugerido en el modelo de replicación de Patton (2001) y colocaría a NSP5 como un intermediario entre VP2 y NSP2. De acuerdo a este modelo, y tomando en cuenta los resultados recientes, una vez formado el complejo de replicación “pre-core” (constituido por VP1, VP3 y RNAm), llegarían dímeros de VP2, seguidos de dímeros de NSP5 y finalmente octámeros de NSP2. NSP5 funcionaría así como el eslabón que une a VP2 y a NSP2 para formar el “core” de la replicación con actividad de replicasa.

XII. Conclusiones

En este estudio encontramos que en células infectadas por rotavirus, una fracción de VP2 se ubica en los viroplasma, sin embargo, la mayor cantidad de VP2 está difusa en el citosol. Asimismo, existe una fracción mínima de VP2 que forma agregados que no se ubican en los viroplasma y cuya función y distribución exacta en el citosol o como parte de compartimentos celulares se desconoce.

Del mismo modo, demostramos que existen células en las cuales la distribución de VP2 es difusa. Nuestros resultados sugieren que dichas células representan infecciones no productivas ya que los viroplasma presentan una morfología alterada. Otro fenómeno aberrante que sucede en células infectadas es la formación de estructuras diferentes a viroplasma auténticos las cuales contienen a NSP2 pero no a la proteína VP2.

Finalmente, encontramos que en ausencia de otras proteínas de rotavirus y de RNA viral la distribución de VP2 es difusa. No obstante, observamos agregados pequeños de VP2 con una frecuencia muy baja; se desconoce si representan agregados auténticos. Demostramos también que los VLSs son capaces de reclutar a la proteína VP2 con una moderada eficiencia lo cual concuerda con resultados recientes de Contin *et al.* (2010).

En resumen, mediante este estudio demostramos que la proteína VP2 tiene patrones de distribución diferentes a los viroplasma. El conocer dicha distribución podría ayudar a encaminar el estudio de las posibles funciones alternativas que pudiera tener la proteína VP2 durante el ciclo replicativo viral.

XIII. Apéndice de medios y soluciones**Buffer de acetatos: 100 ml**

Ácido acético 0.2 M	7.2 ml
Acetato de Na 0.2 M	17.8 ml
dH ₂ O	75 ml

Almacenar a 4 °C

EGTA 3mM

EGTA	11.5 mg
PBS-A	10 ml

IPTG 1000 mM: Stock

IPTG	288.3 mg
H ₂ O milliQ	10 ml

Filtrar. Para hacer alícuotas disolver en MEM con 2.5% de suero fetal bovino (FBS)

Minimum Eagle's Medium (MEM): 1 lt

Medio MEM	950 ml
NaHCO ₃	30 ml
Glutamax	10 ml
Penicilina-Estreptomicina	10 ml
FBS	% requerido

Almacenar a 4 °C

NaHCO₃ al 7.5%

NaHCO ₃	56.25 gr
dH ₂ O	750 ml

Gasificar la solución con CO₂ y filtrar. Almacenar a 4 °C

PBS-A 10X: 1 lt

NaCl	40 gr
KCl	1 gr
Na ₂ HPO ₄	7.2 gr
KH ₂ PO ₄	1.2 gr

PBS-B 10X: 1 lt

MgCl ₂	15 gr
-------------------	-------

PBS-C 10X: 1 lt

CaCl ₂	10 gr.
-------------------	--------

PBS 1X: 100 mL

PBS-A stock	10 ml
PBS-B stock	1 ml
PBS-C stock	1 ml
dH ₂ O estéril	88 mL

PBS 3X

Solución 1 (100 ml)

NaCl	13.33 mg
Na ₂ HPO ₄	6.1 mg
dH ₂ O	100 ml

Solución 2 (100 ml)

NaCl	13.33 mg
NaH ₂ PO ₄	5.71 mg
dH ₂ O	100 ml

Mezclar 100 ml de la solución 1 + 15 ml de la solución 2, ajustar el pH a 7.2 y autoclavar.

PFA 4%: 100 ml

PFA	4 gr
dH ₂ O 60 °C	50 ml

Añadir unas gotas de NaOH 1 N para disolver
PBS 3X 33.3 ml

dH₂O 16.7 ml

Ajustar pH 7.2, filtrar y enfriar en hielo. Almacenar a -20 °C por 2 meses.

Rojo de Fenol 1%

Rojo de fenol 1 gr

NaOH 1 N 0.2 ml

dH₂O 10 ml

Se pueden agregar más gotas de NaOH antes de aforar hasta disolver el colorante.

Solución Sustrato (Inmunoperoxidasa)

Buffer de acetatos 6.75 ml

Aminoetil carboazol (AEC) 1.5 ml

H₂O₂ 37.5 µL

Preparar al momento de utilizar y filtrar.

Tripsina-EDTA: 1 lt

Tripsina 0.05% 500 mg

EDTA 4Na*2H₂O 220 mg

Rojo de fenol 1% 1.6 ml

PBS-A pH 7.4 998.4 ml

Agregar la tripsina al final y filtrar.

Tripsina para rotavirus (2 mg/ml)

Tripsina 100 mg

MEM-Sin suero 50 ml

Filtrar la solución y almacenar a -20 °C

Tripsina para vaccinia (0.25 mg/ml)

Tripsina 12.5 mg

MEM-Sin suero 50 ml

Filtrar la solución y almacenar a -20 °C

Verseno-EDTA: 1 lt

EDTA	0.32 gr
PBS-A	1000 ml

Esterilizar en autoclave. pH: 7.5

XIV. Literatura citada

- Afrikanova, I., Fabbretti, E., Miozzo, M. C. y Burrone, O. R. (1998). Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *J Gen Virol.* **78**:2679-2686.
- Ahmadian, S. y Shahrabadi, M. S. (1999). Morphological study of the role of calcium in the assembly of the rotavirus outer capsid protein VP7. *Biotech Histochem.* **4**:269-277.
- Altenburg, B. C., Graham, D. Y. y Estes, M. K. (1980). Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. *J Gen Virol.* **46**:75-85.
- Aponte, C., Poncet, D. y Cohen, J. (1996). Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells using a monoclonal antibody against NSP2. *J Virol.* **70**:985-991.
- Ayala-Bretón, C., Arias, M., Espinosa, R., Romero, P, Arias, C. F. y López, S. (2009). Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *J Virol.* **83**:8819-8831.
- Bar-Magen, T., Spencer, E., Patton, J. T. (2007). An ATPase activity associated with the rotavirus phosphoprotein NSP5. *Virology.* **369**:389-99.
- Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D. y Cohen, J. (2003). Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *J Virol.* **77**:1757-1763.
- Blackhall, J., Fuentes, A., Hansen, K. y Magnusson, G. (1997). Serine protein kinase activity associated with rotavirus phosphoprotein NSP5. *J Virol.* **71**:138-144.
- Boyle, J. F. y Holmes, K. V. (1986). RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J Virol.* **51**:561-568.
- Bresse, J. S., Hummelman, E., Nelson, E. A., *et al.* (2005). Rotavirus in Asia: the value of surveillance for informing decisions about the introduction of new vaccines. *J Infect Dis.* **S192**:S1-S5.
- Cabral-Romero, C. y Padilla-Noriega, L. (2006). Association of rotavirus viroplasm with microtubules through NSP2 and NSP5. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **101**(6):603-611.
- Campagna, M., Eichwald, C., Vascotto, F., *et al.* (2005). RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J Gen Virol.* **86**:1481-1487.
- Carter, B. J. y Saunders, A. V. (2007). *Virology: Principles and Applications.* John Wiley & Sons, Ltd. New York.
- Chen, C., Di, L. y Guo, N. (2009). Regulation of cellular and viral protein expression by the Epstein-Barr virus transcriptional regulator Zta: implications for therapy of EBV associated tumors. *Cancer Biol Ther.* **8**:987-995.
- Chizhikov, V. y Patton, J. T. (2000). A four-nucleotide translation enhancer in the 3'-terminal consensus sequence of the nonpolyadenylated mRNAs of rotavirus. *RNA.* **6**:814-825.

- Clark, S. M., Barnett, B. B. y Spendlove, R. S. (1979). Production of high-titer bovine rotavirus with trypsin. *J Clin Microbiol.* **9**:413-417.
- Clark, B. y Desselberger, U. (1988). Myristylation of rotavirus proteins. *J Gen Virol.* **69**:2681-2686.
- Cohen, J. (1977). Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus. *J Gen Virol.* **36**:395-402.
- Cohen, J., Laporte, J., Charpilienne, A. y Scherrer, R. (1979). Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch Virol.*, **60**:177-186.
- Contin, R., Arnoldi, F., Campagna, M. y Burrone, O. R. (2010). Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. *J Gen Virol.* **91**:1782-93.
- Crawford, S. E., Patel, D. G., Cheng, E., *et al.* (2006). Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. *J Virol.* **80**:4820-32.
- Dormitzer, P. R. y Greenberg, H. B. (1992). Calcium chelation induces a conformational change in recombinant herpes simplex virus-1 expressed rotavirus VP7. *Virology.* **189**:828-832.
- Eichwald, C., Rodriguez, J. F. y Burrone, O. R. (2004). Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *Journal of General Virology.* **85**:625-634.
- Elroy-Stein, O. y Moss, B. (2001). Gene expression using the vaccinia virus/T7 RNA polymerase hybrid system. *En: "Current Protocols in Molecular Biology"* (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl, Eds.), Vol. 3. Wiley. New York.
- Ericson, B. L., Graham, D. Y., Mason, B. B., *et al.* (1983). Two types of glycoprotein precursors are produced by the Simian rotavirus SA11. *Virology.* **127**:320-332.
- Espejo, R. T., López, S. y Arias, C. (1981). Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* **37**:156-160.
- Estes, M. K. (1997). Rotaviruses and their replication. pp. 1747-1785. *En: "Fields of Virology"* (D. M. Knipe y P. M. Howley, Eds.) LWW. USA.
- Estes, M. K. (2001). Rotaviruses and their replication. pp. 1747-1785. *En: "Fields of Virology"* (D. M. Knipe y P. M. Howley, Eds.) LWW. USA.
- Estes, M. K., Graham, D. Y. y Mason, B. B. (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J Virol.* **39**:879-888.
- Estes, M. K. y Kapikian, A. Z. (2006). Rotaviruses. pp. 1917-1974. *En: "Fields of Virology"* (D. M. Knipe y P. M. Howley, Eds.) LWW. USA.
- Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F. y Burrone, O. R. (1999). Two non-structural rotavirus proteins NSP2 y NSP5 form viroplasms like-structures in vivo. *Journal of General Virology.* **80**:333-339.

- Fiore, L., Greenberg, H. B. y Mackow, E. R. (1991). The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology*. **181**:553-563.
- Fischer, T., Bresse, J. y Glass, R. (2004). Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children. *Vaccine*. **S1**:S49-S54.
- Flewett, T. H., Bryden, A. S. y Davies, H. (1974). Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet*. **2**:61-63.
- Fukudome, K., Yoshie, O. y Konno, T. (1989). Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirements of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. *Virology*. **172**:196-205.
- Gallegos, C. O. y Patton, J. T. (1989). Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology*. **172**:616-627.
- Giachetti, C. y Holland, H. H. (1989). Vesicular stomatitis virus and its defective interfering particles exhibit *in vitro* transcriptional and replicative competition for purified L-NS polymerase molecules. *Virology*. **170**:264-267.
- González, R. A., Espinosa, R., Romero, P., López, S. y Arias, C. F. (2000). Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Archives of Virology*. **145**:1963-1973.
- González, S. A. y Burrone, O. R. (1991). Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine. *Virology*. **182**:8-16.
- Gorziglia, M. y Esparza, J. (1981). Poly(A) polymerase activity in human rotavirus. *J Gen Virol*. **53**:357-362.
- Groft, C. M. y Burley, S. K. (2002). Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol Cell*. **9**:1273-1283.
- Guerrant, R. L., Kirchhoff, L. V., Shields, D. S., *et al.* (1983). Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. *J Infect Dis*. **148**:986-997.
- Harlow, E. y Lane, D. (1998). Using Antibodies. A laboratory manual. CSH Laboratory Press. USA.
- Hoshino, Y., Sereno, M. M., Midthun, K., Flores, J., Kapikian, A. Z., Chanock, R. M. (1985). Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **82**:8701-8704.
- Huang, A. S. y Baltimore, D. (1970). Defective viral particles and viral diseases processes. *Nature*. **226**:325-327.
- Imai, M., Akatani, K., Ikegami, N., *et al.* (1983). Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J Virol*. **47**:125-136.

- Jayaram, H., Taraporewala, Z., Patton, J. T. y Prasad, B. V. (2002). Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold. *Nature*. **417**:311-315.
- Jourdan, N., Cotte, L. J., Forestier, F., *et al.* (1995). Infection of cultured human intestinal cells by monkey RRV and human Wa rotavirus as a function of intestinal epithelial cell differentiation. *Res Virol*. **146**:325-331.
- Kapahnke, R., Rappold, W., Desselberger, U., *et al.* (1986). The stiffness of dsRNA: hydrodynamic studies on fluorescence-labelled RNA segments of bovine rotavirus. *Nuc Ac Res*. **14**:3215-3228.
- Kapikian, A. Z., Kim, H. W., Wyatt, R. G., *et al.* (1974). Reoviruslike agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science*. **185**:1049-1053.
- Kattoura, M. D., Chen, X. y Patton, J. T. (1994). The rotavirus RNA-binding protein NS35 (NSP2) forms 10S multimers and interacts with the viral RNA polymerase. *Virology*. **202**:803-813.
- Keljo, D. J. y Smith, A. K. (1988). Characterization of binding of simian rotavirus SA11 to cultured epithelial cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. **7**:249-256.
- Kumar, M., Jayaram, H., Vasquez-Del Carpio, *et al.* (2007). Crystallographic and biochemical analysis of rotavirus NSP2 with nucleotides reveals a nucleoside diphosphate kinase-like activity. *J Virol*. **22**:12272-84.
- Labbé, M., Charpilienne, A., Crawford, S. E., Estes, M. K. y Cohen, J. (1991). Expression of rotavirus VP2 produces empty core like particles. *Journal of Virology*. **65**:2946-2952.
- Lawton, J. A., Estes, M. K. y Prasad, B. V. (1997). Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Biol*. **4**:118-121.
- Lawton, J. A., Estes, M. K. y Prasad, B. V. (1999). Comparative structural analysis of transcriptionally competent and incompetent rotavirus-antibody complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**:5428-5433.
- López, T., Rojas, M., Ayala-Bretón, C., López, S. y Arias, C. (2005). Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *J Gen Virol*. **86**:1609-1617.
- Lu, X., Tao, Y. y Caprio, R. (2006). Crystal structure of rotavirus RNA polymerase VP1. Abstract, p.130 of the 2006 Keystone Symposia, "Structural Genomics", Abstract Book, Steamboat Springs, CO.
- Ludert, J. E., Michelangeli, F., Gil, F., *et al.* (1987). Penetration and uncoating of rotavirus in cultured cells. *Intervirology*. **27**:95-101.
- Matsui, S. M., Offit, P. A., Vo, P. T., Mackow, E. R., Benfield, D. A., Shaw, R. D., Padilla-Noriega, L. y Greenberg, H. B. (1989). Passive protection against rotavirus-induced diarrhea

- by monoclonal antibodies to the heterotypic neutralizing domain of VP7 and the VP8 fragment of VP4. *J. Clin. Microbiol.* **27**:780-782.
- Mattion, N. M., Mithcell, D. B., Both, G. W., *et al.* (1991). Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology.* **181**:295-304.
- Mattion, N. M., Cohen, J. y Estes, M. K. (1994). The rotavirus proteins. pp. 169-250. *En: "Viral Infections of the Gastrointestinal Tract"* (Kapikian, A. Z., Ed.) Marcel Dekker, Inc. New York.
- McCrae, M. A. y McCorquodale, J. G. (1983). Molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of viral RNA species. *Virology.* **126**:204-212.
- Miller, G., El-Guindy, A., Countryman, J., Ye, J. y Gradoville, J. (2007). Lytic cycle switches of oncogenic human gammaherpesviruses. *Adv Cancer Res.* **97**:81-109.
- Musalem, C. y Espejo, R. T. (1985). Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. *J Gen Virol.* **66**:2715-2724.
- Niller, H. H., Wolf, H., Minarovich, J. (2008). Regulation and dysregulation of Epstein-Barr virus latency: Implications for the development of autoimmune diseases. *Autoimmunity.* **41**:298-328.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). *Sistema de información estadística de la OMS.* (2009). <http://www.who.int/es> [Consulta: 28 de Abril de 2009].
- Padilla-Noriega, L., Paniagua, M. y Guzman-Leon, S. (2002). Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology.* **298**:1-7.
- Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresse, J. S., *et al.* (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* **12**:304-306.
- Parashar, U. D., Holma, R. C., Bresse, J. S., *et al.* (1998). Epidemiology of diarrheal disease among children enrolled in four West Coast health maintenance organizations. Vaccine Safety Datalink Team. *Pediatr Infect Dis J.* **17**:605-611.
- Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A. y Glass, R. I. (2003). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* **9**:565-572.
- Patton, J. T. (2001). Rotavirus RNA replication and gene expression. Novartis Found. Symp. **238**:64-81.
- Patton, J. T. y Spencer, E. (2000). Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology.* **277**:217-225.
- Perrault, J. (1981). Origin and replication of defective interfering particles. *Curr Top Microbiol Immunol.* **93**:151:207.
- Petrie, B. L., Graham, D. Y. y Estes, M. K. (1981). Identification of rotavirus particle types. *Intervirology.* **16**:20-28.

- Petrie, B. D., Graham, D. Y., Hanssen, H. y Estes, M. K. (1982). Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immuocytochemistry. *Journal of General Virology*. **63**:457-467.
- Petrie, B. L., Greenberg, H. B., Graham, D. Y. y Estes, M. K. (1984). Ultrastructural localization of rotavirus antigen using colloidal gold. *Virus Res.* **1**:133-152.
- Piron, M., Vende, P., Cohe, J., *et al.* (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* **17**:5811-5821.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. y Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *The EMBO J.* **8**:3867-3874.
- Pourasgari, F., Ahmadian, S. y Salmanian, A. H. (2007). Expression and characterization of VP2 protein of human rotavirus A in a mammalian lung cell line. *Acta virol.* **51**(4):261-264.
- Prasad, B. V., Rothnagel, R., Zeng, C. Q., *et al.* (1996). Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes of rotavirus. *Nature.* **382**:417-473.
- Prasad, B. V., Wang, G. J., Clerx, J. P. y Chiu, W. (1988). Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol.* **199**:269-275.
- Rodríguez-Angulo, E., González-Losa, M., Polanco-Marín, G., *et al.* (2002). Rotavirus infections in Yucatan, Mexico, in 2000. *Rev Invest Clin.* **54**:497-500.
- Ruggeri, F. M., y Greenberg, H. B. (1991). Antibodies to the Trypsin Cleavage Peptide VP8* neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J Virol.* **65**:2211-2219.
- Ruiz, M. C., Cohen, J. y Michelangeli, F. (2000). Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium.* **28**:137-149.
- Sen, A., Sen, N. y Mackow, E. (2007). The formation of viroplasm-like structures by the rotavirus NSP5 protein is calcium regulated and directed by a C-terminal helical domain. *J Virol.* **81**:11758-11767.
- Shahrabadi, M. S., Babiuk, L. A. y Lee, P. W. (1987). Further analysis of the role of calcium in rotavirus morphogenesis. *Virology.* **152**:298-307.
- Shaw, R. D., Fong, K. J., Losonsky, G. A., Levine, M. M., Maldonado, Y., Yolken, R., Flores, J., Kapikian, A. Z., Vo, P. T. y Greenberg, H. B. (1987). Epitope-specific immune responses to rotavirus vaccination. *Gastroenterology.* **93**:941-950.
- Shaw, R. D., Stoner-MA D.L., Estes, M. K. y Greenberg, H. B. (1985). Specific enzyme-linked immunoassay for rotavirus serotypes 1 and 3. *J Clin Microb.* **22**:286-291.
- Shaw, R. D., Vo, P. T., Offit, P. A., Coulson, B. S. y Greenberg, H. B. (1986). Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus. *Virology.* **155**:434-451.
- Silvestri, L. S., Taraporewala, Z. F. y Patton, J. T. (2004). Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *J Virol.* **78**:7763-7774.

- Silvestri, L. S., Tortorici, M. L., Vásquez-Del Carpio, R. y Patton, J. T. (2005). Rotavirus protein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. *J Virol.* **79**: 15165–15174.
- Spencer, E. y Arias, M. L. (1981). In vitro transcription catalyzed by heat-treated human rotavirus. *J Virol.* **40**:1-10.
- Stacy-Phipps, S. y Patton, J. T. (1987). Synthesis of plus- and minus- strand RNA in rotavirus-infected cells. *J Virol.* **61**:3479-3484.
- Svensson, L., Padilla-Noriega, L., Taniguchi, K. y Greenberg, H. B. (1990). Lack of cosegregation of the subgroup II antigens on genes 2 and 6 in porcine rotaviruses. *Journal of Virology.* **64**:411-413.
- Svensson, L., Sheshberadaran, H., Vesikari, T., Norrby, E. y Wadell, G. (1987). Immune response to rotavirus polypeptides after vaccination with heterologous rotavirus vaccines (RIT 4237, RRV-1). *J Gen Virol.* **68**:643-651.
- Tanaka, T. N., Conner, M. E., Graham, D. Y., *et al.* (1988). Molecular characterization of three rabbit rotavirus strains. *Arch Virol.* **98**:253-265.
- Taniguchi, K., Urasawa, S. y Urasawa, T. (1984). Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J Gen Virol.* **66**:1045-1053.
- Taraporewala, Z., Chen, D. y Patton, J. T. (1999). Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *J Virol.* **73**:9934-9943.
- Taraporewala, Z. y Patton, J. T. (2001). Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. *J Virol.* **75**:4519-4527.
- Vasquez-Del Carpio, R., Gonzalez-Nilo, F. D., Riadi, G., Taraporewala, Z. F. y Patton, J. T. (2006). Histidine triad-like motif of the rotavirus NSP2 octamer mediates both RTPase and NTPase activities. *JMB.* **362**:539-554.
- Vende, P., Tortorici, M. A., Taraporewala, Z. F. y Patton, J. T. (2003). Rotavirus NSP2 interferes with the core lattice protein VP2 in initiation of minus-strand synthesis. *Virology.* **313**:261-273.
- Ward, R. L., Knowlton, D. R. y Pierce, M. J. (1984). Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *J Clin Microbiol.* **19**:748-753.
- Ward, G. A., Stover, C. K., Moss, B. y Fuerst, T. R. (1995). Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**:6773-6777.
- Welch, S. K., Crawford, S. E. y Estes, M. K. (1989). Rotavirus SA11 genome segment 11 protein is a nonstructural phosphoprotein. *J Virol.* **63**:3974-3982.

- Wentz, M. J., Patton, J. T y Ramig, R. F. (1996). The 3'-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. *J Virol.* **70**:7833-7841.
- Wentz, M. J., Zeng, C. Q.-Y., Patton, J. T., Estes, M. K. y Ramig, R. F. (1996). Identification of the minimal replicase, and the minimal promoter of (-)-strand synthesis, functional in rotavirus RNA replication in vitro. *Archives of Virology.* **12**:59-67.
- Yolken, R., Arango-Jaramillo, A., Eiden, I., *et al.* (1988). Lack of genome reassortment following infection of infant rats with group A and group B rotaviruses. *J Infect Dis.* **158**:1120-1123.
- Zarate, S., Espinosa, R., Romero, P., *et al.* (2000). The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J Virol.* **74**:593-599.
- Zeng, C. Q., Estes, M. K., Charpilienne, A. y Cohen, J. (1998). The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. *J Virol.* **72**:201-208.
- Zurzolo, C. y Rodriguez-Boulan, E. (1994). Lipid-Tagged Proteins. pp. 296-297. *En: "Cell Lipids"* (D. Hoekstra, Ed.) Academic Press. USA.