



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**“LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS PORCINO EN CÉLULAS POLARIZADAS
DE INTESTINO DE PUERCO”**

TITULACIÓN POR TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

DIEGO CEVALLOS PORTA

TUTOR: PAVEL ISA HASPRA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN

DRA. ROSA VICTORIA PANDO ROBLES

DRA. LILIANA PARDO LÓPEZ

DRA. YVONNE JANE ROSENSTEIN AZOULAY

DR. ENRIQUE SALAS VIDAL

MEXICO D. F. DICIEMBRE 2012



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.

*Le dedico esta tesis a
Helena Porta Ducoing,
Miguel Angel Cevallos Gaos
y Sandra Lavaniegos García*

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de la Dra. Susana López Charretón y el Dr. Carlos Arias Ortiz del Departamento de Genética y Fisiología Molecular en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección del **Dr. Pavel Isa**. Durante la realización de este trabajo conté con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). El proyecto fue desarrollado gracias al donativo de CONACyT número 102823.

Comité Tutorial:

Dra. Leonor Pérez Martínez

Dr. Ramón Gonzáles García Conde

Dr. Pavel Isa

Jurado de Examen:

Dra. Susana Castro Obregón

Dra. Rosa Victoria Pando Robles

Dra. Liliana Pardo López

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay

Dr. Enrique Salas Vidal

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mi tutor, Pavel Isa, por su apoyo y esfuerzo durante la realización de este trabajo; a mi comité tutorial, Leonor Pérez y Ramón Gonzáles por el tiempo que invirtieron en esta tesis y por todas sus sugerencias, y a todos los integrantes del laboratorio de Susana López y Carlos Arias por su amistad, compañerismo y colaboración. A mis amigos por su mala y buena influencia, en especial a Ivan Madrigal por su ayuda. Al profesor Lot Froy y a todos los del Ninjutsu. Pero sobre todo agradezco a Helena Porta, Miguel Angel Cevallos y Sandra Lavaniegos por todo lo que han hecho por mi y el apoyo que me han dado.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	8
LISTA DE ABREVIACIONES	9
INTRODUCCIÓN	11
LAS VÍAS ENDOCÍTICAS CELULARES.....	14
<i>La Vía Endocítica Dependiente de Clatrina</i>	14
<i>La Vía Endocítica Dependiente de Caveolina</i>	16
<i>La Vía Endocítica Dependiente de Flotilina</i>	17
LA INHIBICIÓN DE LAS VÍAS ENDOCÍTICAS CELULARES	18
<i>La Expresión de Proteínas Mutantes Dominantes Negativas</i>	18
<i>El Silenciamiento por Medio de siRNA</i>	19
<i>Los Tratamientos Químicos</i>	20
ANTECEDENTES	22
LA ENTRADA DE ROTAVIRUS A LA CÉLULA.....	22
LOS ROTAVIRUS PORCINOS	23
LA LÍNEA CELULAR IPEC-J2	24
LA INFECCIÓN EN CÉLULAS POLARIZADAS	26
OBJETIVOS	29
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS PARTICULARES	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
RESULTADOS	37
LOS CULTIVOS DE CÉLULAS IPEC-J2 SE POLARIZAN AL CRECERLAS CON DEXAMETASONA EN FILTROS TRANSWELL	37
LA CARA BASOLATERAL DE LOS CULTIVOS DE IPEC-J2 POLARIZADOS ES MÁS SENSIBLE A LA INFECCIÓN POR LA CEPA YM DE ROTAVIRUS QUE LA CARA APICAL	39
LOS TRATAMIENTOS CELULARES CON NEURAMINIDASA DISMINUYEN LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS DE LA CARA APICAL Y BASOLATERAL DE CULTIVOS POLARIZADOS DE IPEC-J2	39
LOS TRATAMIENTOS CELULARES CON SACAROSA PREVIOS A LA INFECCIÓN DISMINUYEN LA ENTRADA DE LOS ROTAVIRUS A LOS CULTIVOS POLARIZADOS DE IPEC-J2	40
LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL DE LA MEMBRANA CELULAR ES ESENCIAL PARA LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS EN CÉLULAS POLARIZADAS IPEC-J2	41
LA INFECCIÓN POR LOS ROTAVIRUS DE LAS CÉLULAS POLARIZADAS DE IPEC-J2 NO REQUIERE DE LA ACIDIFICACIÓN ENDOSOMAL	42
LA INHIBICIÓN DE LA DINAMINA POR DYNASORE NO AFECTA LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS EN CULTIVOS POLARIZADOS DE IPEC-J2.....	43
LA SALIDA DE LA PROGENIE VIRAL DE ROTAVIRUS AL INFECTAR CULTIVOS POLARIZADOS ES PRINCIPALMENTE POR LA CARA APICAL	44

LA CARA BASOLATERAL DE LOS CULTIVOS DE IPEC-J2 POLARIZADOS ES MÁS SENSIBLE A LA INFECCIÓN POR LA CEPA WA Y SU INFECTIVIDAD ES RESISTENTE A NA	45
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIÓN.....	65
BIBLIOGRAFÍA.....	69

RESUMEN

El rotavirus es un virus no envuelto, miembro de la familia *Reoviridae*, causante de diarrea severa en niños y un problema importante para la salud mundial. Aunque *in vivo* los rotavirus infectan enterocitos maduros del intestino delgado, su infección se ha estudiado principalmente en la línea de riñón de mono verde MA104. Esta línea es muy permisiva a la infección pero se aleja de lo que ocurre en su hospedero natural, y esto puede generar resultados erróneos.

En este trabajo se caracterizó de manera general, la infección por rotavirus en la línea celular IPEC-J2. Esta línea es un buen modelo experimental, ya que es una línea intestinal no transformada, derivada de células epiteliales del intestino delgado de puercos y es capaz de polarizarse y formar microvellosidades en su cara apical.

Primero se determinó que la cara basolateral de los cultivos polarizados de IPEC-J2 era aproximadamente diez veces más sensibles a la infección por las cepas YM y Wa de rotavirus. Las células con la cara basolateral descubierta por medio de una herida mecánica, son más susceptibles a la infección que aquellas dentro de la monocapa celular. Estos resultados sugieren, que algunos de los receptores utilizados por el virus para infectar de manera eficiente la célula, se encuentran en la cara basolateral de los cultivos.

Más adelante, por medio de tratamientos químicos, se caracterizó la entrada de la cepa YM, por ambas caras de los cultivos polarizados. La entrada de esta cepa por ambas caras celulares es independiente de la proteína dinamina. No necesita de acidificación endosomal, y depende de la concentración normal de colesterol de la membrana. De manera particular, la entrada del virus por la cara apical es más sensible a los tratamientos con sacarosa, mientras que la entrada por la cara basolateral lo es a los tratamientos con bafilomicina A1. Por ultimo, después del ciclo infeccioso, la progenie viral se libera principalmente por la cara apical, sin importar por cual de las dos caras empiece la infección.

LISTA DE ABREVIACIONES

AP2 - (*Adaptor Protein 2*) Proteína Adaptadora 2.

ARF6 - (*ADP-ribosylation Factor 6*) Factor 6 de ADP – ribosilación.

Caco-2 - Línea celular de células humanas de adenocarcinoma epitelial colorectal número 2.

DAPI - (*4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DLP - (*Double Layered Particle*) Partícula de dos capas.

DMEM - (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) Medio Eagle Modificado por Dulbecco.

DMEM/F12 - (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12*) medio de Eagle modificado por Dulbecco: Mezcla nutritiva F12.

EDTA - (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*) Ácido etilendiaminotetraacético.

ELISA - (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

FBS - (*Fetal Bovine Serum*) Suero fetal bovino.

GD1a - (*Disialoganglioside 1a*) Disialogangliósido 1^a.

GD3 - (*Disialoganglioside 3*) Disialogangliósido 3.

GM1 - (*Monosialotetrahexosylganglioside 1*)

Monosialotetrahexosilgangliósido 1.

GM3 - (*Monosialotetrahexosylganglioside 3*) Monosialotetrahexosilgangliósido 3.

GPI-AP - (*Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins*) Proteínas ancladas a glucosil fosfatidilinositol.

GTP - Guanosina-5'-trifosfato.

HBSS - (*Hank's Buffered Salt Solution*) Solución Salina Balanceada de Hank

IBT - Instituto de Biotecnología.

IPEC-1 - (*Intestinal Porcine Epithelial Cells – 1*) Células Epiteliales de

intestino de puerco.

IPEC-J2 - (*Intestinal Porcine Epithelial Cells – Jejunum 2*) Células Epiteliales de intestino de puerco de Yeyuno 2

MA104 - Células Epiteliales de riñón de mono.

MDCK - (*Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells*) Células epiteliales de riñón canino de Madin-Darby.

MDCKII - (*Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells II*) Células epiteliales de riñón canino de Madin-Darby cepa II.

MOI - (*Multiplicity of Infection*) Multiplicidad de Infección.

MBCD - (*Methyl-β-cyclodextrin*) Metil-β-Ciclodextrina.

NA - Neuraminidasa

OSU - Cepa de Rotavirus Porcino “Ohio State University”

PBS - (*Phosphate Buffered Saline Solution*) Solución salina amortiguadora de fosfatos.

RISC – (*RNA Induced Silencing Complex*) Complejo de silenciamiento inducido por RNA.

RNA - (*Ribonucleic Acid*) Ácido ribonucleico.

RNAi - (*RNA Interference*) Interferencia por RNA.

RRV - (*Rheus’ Rotavirus*) Cepa de rotavirus de simio.

SA - (*Sialic Acids*) Ácidos siálicos

siRNA - (*Small Interfering Ribonucleic Acid*) Ácido ribonucleico pequeño de interferencia.

SV40 - (*Simian Virus 40*) Virus de Simio 40.

TER - (*Transepithelial Electric Resistance*) Resistencia eléctrica transepitelial.

TFR41 - Cepa de rotavirus porcino “TFR41”.

UFF - Unidades Formadoras de Focos.

UK - Cepa de rotavirus bovino “UK”.

VP - (*Viral Protein*) Proteína viral.

Wa - Cepa de rotavirus humana “Wa”.

INTRODUCCIÓN

Los rotavirus son los principales agentes etiológicos que causan diarrea severa tanto en niños, especialmente aquellos menores de 5 años, como en las crías de varias especies animales. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, entre 420,000 y 620,000 niños mueren anualmente por diarrea relacionada con los rotavirus (Desselberger *et al.*, 2009) (figura 1). *In vivo*, estos virus infectan enterocitos maduros de las microvellosidades del intestino delgado.

Los rotavirus son virus no envueltos, miembros de la familia *Reoviridae*, cuya partícula viral madura mide 1,000 Å de diámetro y consta de una cápside icosaédrica de tres capas concéntricas formadas por proteínas: una capa externa; una capa intermedia y una capa de núcleo interno que envuelve el genoma viral. La capa externa de la cápside está formada por 260 trímeros de la proteína VP7 y 60 proyecciones de la proteína VP4. La proteína VP4, junto con la proteína VP7 tiene el papel de unirse a los receptores en la superficie de la célula huésped y se encarga de la entrada celular. La capa intermedia está formada por 260 trímeros de la proteína VP6. Por último, la capa del núcleo interno viral está formada por la proteína VP2, ésta envuelve a los 11 segmentos de RNA de doble cadena del genoma viral, a VP1 (RNA polimerasa dependiente de RNA) y a VP3 (guanilil transferasa) (figura 2). La capa intermedia junto con la capa del núcleo interno, forma una partícula de dos capas (DLP) que no es infecciosa, pero que es transcripcionalmente activa (López y Arias, 2004).

Los rotavirus se clasifican de manera serológica en distintos serogrupos y a su vez cada serogrupo se divide en varios serotipos y/o genotipos. Los rotavirus de un serogrupo comparten antígenos que tienen reactividad cruzada. Estos antígenos se encuentran en las proteínas estructurales del virus y en la mayoría de las proteínas no estructurales, pero generalmente se utiliza VP6 para el diagnóstico por ELISA. Los rotavirus se dividen en siete serogrupos que se nombran de la A a la G. Los serogrupos A, B y C infectan tanto humanos como

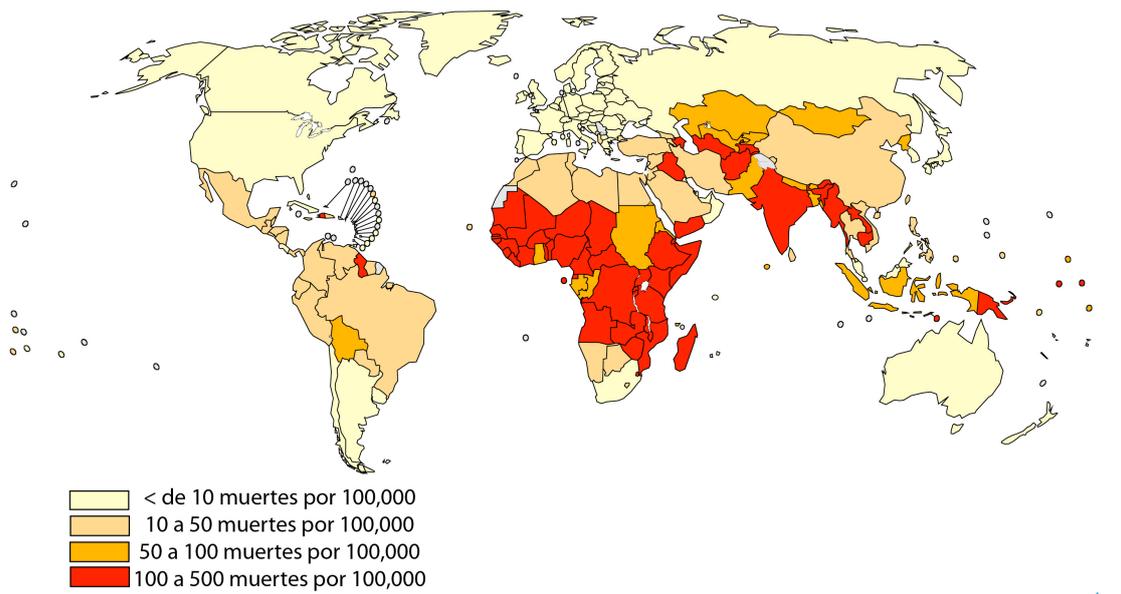


Figura 1. Mapa mundial que muestra el número de muertes causadas por rotavirus por cada 100,000 niños. La ltima actualización de los datos fue en Julio del 2009. Modificada de http://www.who.int/nuvi/rotavirus/decision_implementation/en/.

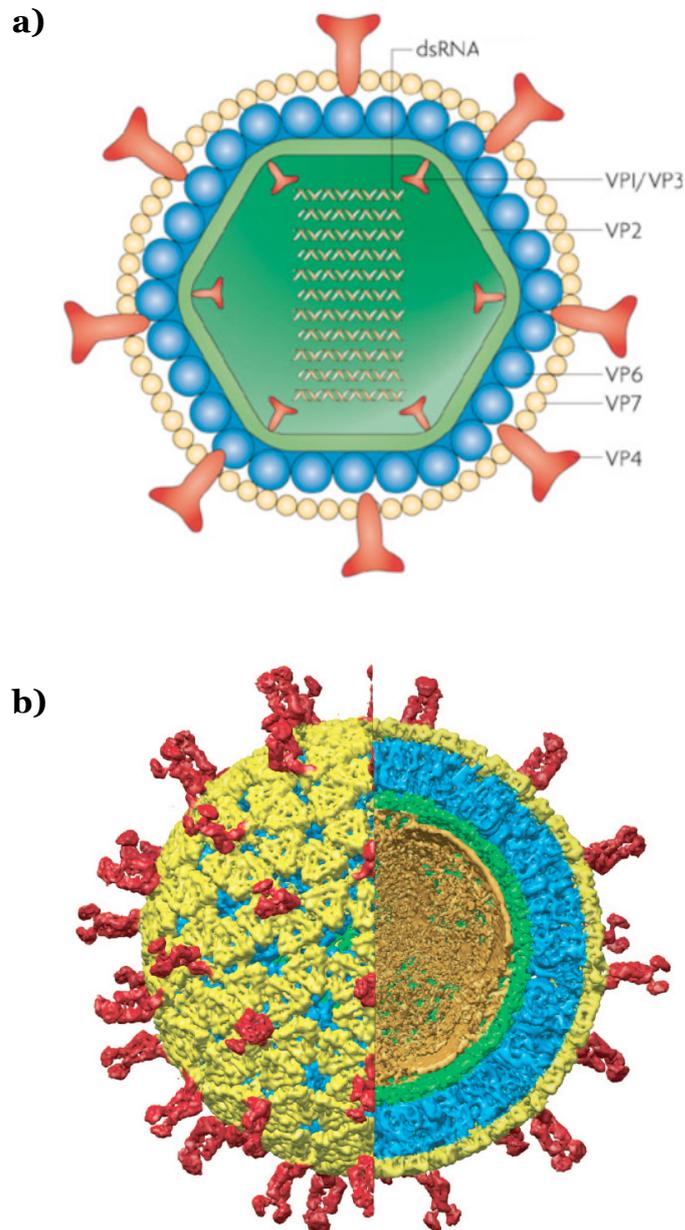


Figura 2. La estructura del virión de Rotavirus. a) Representación gráfica del virión de rotavirus localizando sus proteínas estructurales y sus 11 segmentos de RNA de doble cadena (Angel *et al.*, 2007). b) Reconstrucción de una criomicroscopía electrónica con una resolución de 9.5-Å mostrando de rojo VP4, de amarillo VP7 de azul VP6, de verde VP2 y de naranja el complejo de VP1/VP3 con el RNA de doble cadena (Li *et al.*, 2009).

animales, mientras que los serogrupos D, E, F y G solo se han encontrado en animales. Los rotavirus del serogrupo A son los usuales cuasantes de diarrea infantil, mientras que los del serogrupo B únicamente se han asociado con diarreas en epidemias anuales en China (Su *et al.*, 1986) y los del serogrupo C solo se han encontrado de manera ocasional en heces de niños con diarrea y no se conoce bien su relevancia clínica. La mayor parte de la información sobre la infección de los rotavirus se refiere a los rotavirus del serogrupo A, ya que tan solo algunas de las cepas de los demás serogrupos se han logrado cultivar de manera exitosa en el laboratorio.

El serogrupo A se divide de manera binaria de acuerdo a ensayos de neutralización con antisuero hiperinmune en contra de los principales blancos antigénicos de rotavirus, las proteínas de la capa externa (VP4 y VP7). Los serotipos P se determinan en base a la proteína VP4, y los G, en base a ensayos dirigidos contra la proteína VP7. Se han identificado 14 serotipos diferentes para VP7 y 13 serotipos para VP4 y éstos se denotan con un número después de la letra G y P respectivamente. Los virus también se pueden separar de acuerdo al análisis de sus secuencias de VP4 y VP7, en genotipos. Actualmente se han descrito 23 genotipos para VP7 y 32 para VP4 (Matthijssens *et al.*, 2009), éstos se muestran con un número entre corchetes después del serotipo. Por ejemplo el genotipo y serotipo de la cepa humana Wa es G1[1]P1[8].

In vitro, las partículas virales necesitan ser procesadas por tripsina para poder infectar a las células de manera eficiente. Esta proteasa corta a la proteína VP4 (de 776 aminoácidos) de manera secuencial y específica dando lugar a los péptidos VP8* (del aminoácidos 1 al 231 en RRV) y VP5* (del aminoácidos 248 al 776 en RRV) (figura 3) (Arias *et al.*, 1996; Estes *et al.*, 1981). Este corte proteolítico no es necesario para la unión del virus con la superficie celular, pero si es indispensable para su entrada al interior de la célula (Kaljot *et al.*, 1988). *In vivo*, la infección de rotavirus se lleva a cabo en el intestino delgado del hospedero. Este órgano contiene grandes cantidades de enzimas proteolíticas necesarias para la absorción de los nutrientes ingeridos durante la alimentación y por lo que podemos proponer que los rotavirus activan su infección utilizando

estas enzimas proteolíticas de manera similar a lo que ocurre con la tripsina *in vitro*.

La entrada de los rotavirus se ha estudiado principalmente en la línea celular epitelial de riñón de mono MA104 y se ha visto que es un proceso de varios pasos que involucra la interacción de VP8*, VP5* y VP7 con varias moléculas como las integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_x\beta_2$, el ácido siálico (SA), la proteína de choque térmico Hsc70 y algunos gangliósidos (Coulson *et al.*, 1997; Guerrero *et al.*, 2000; Hewish *et al.*, 2000; Ciarlet *et al.*, 2002; Guerrero *et al.*, 2002; Graham *et al.*, 2003; López y Arias, 2004). La mayoría de estas moléculas se encuentran embebidas en microdominios lipídicos y los rotavirus se han visto asociados con estos dominios durante su entrada a la célula (Isa *et al.*, 2004; Cuadras y Greenberg, 2003) (figura 4).

El tratamiento de las células con neuraminidasa (NA) (enzima que remueve los SA terminales de los gangliósidos y de las glucoproteínas) reduce de manera diferencial la infectividad de algunas cepas de rotavirus, lo que da a lugar a la clasificación de cepas NA-sensibles (baja infectividad con el tratamiento) y NA-resistentes (la infectividad no se afecta por el tratamiento) (Ciarlet y Estes, 1999). Estos resultados iniciales no implican que las cepas resistentes a NA no utilicen el SA para unirse a la superficie celular, ya que estas cepas podrían reconocer los SA subterminales que son resistentes al tratamiento con NA (Guo *et al.*, 1999; Isa *et al.*, 2006). Por medio de espectrometría de resonancia magnética nuclear, se observó que la proteína VP8 de la cepa NA-resistente de rotavirus Wa interacciona con los SA subterminales presentes en los gangliósidos GM1 y GD1a (Haselhorst *et al.* 2009).

Como se mencionó anteriormente, la entrada del rotavirus a la célula es un proceso que involucra varias interacciones moleculares de una manera secuencial y coordinada. El primer contacto con la célula ocurre entre los receptores celulares que contengan SA y el dominio VP8* de VP4. Esta primera interacción posiblemente provoca un cambio conformacional de VP4 lo que permite que VP5* interaccione con la integrina $\alpha_2\beta_1$. Después los rotavirus interaccionan con

Receptores Celulares Involucrados en la Entrada de Rotavirus
Ácidos Siálicos
Gangliósidos GM1 GM3
Integrinas: $\alpha_2\beta_1$ $\alpha_4\beta_1$ $\alpha_x\beta_2$ $\alpha_v\beta_3$
hsc70

Figura 4. Tabla de las moléculas celulares utilizadas por los rotavirus durante su entrada a la célula.

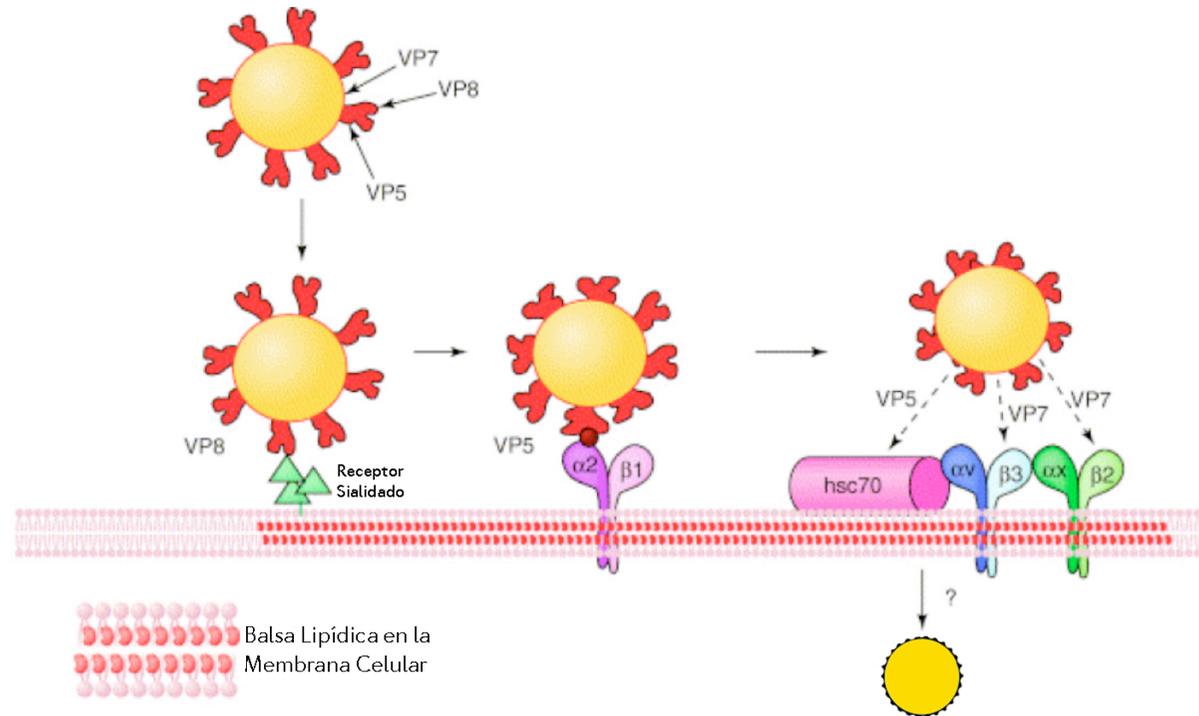


Figura 5. El modelo gráfico del mecanismo de entrada de la cepa RRV. La primera interacción del virus con la célula se lleva a cabo entre la proteína viral VP8 y un receptor sialidado celular. Después, las proteínas VP5 y VP7 interactúan con las integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_x\beta_2$ y con la proteína hsc70, las cuales se encuentran enriquecidas en las balsas lipídicas de la membrana celular (López y Arias, 2004).

Hsc70 por medio de VP5* y con $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_x\beta_2$ por medio de VP7. El orden de estas últimas interacciones aun no se ha determinado (López y Arias, 2004) (figura 5). Este modelo se basa en la cepa RRV cuya entrada es la más estudiada y no necesariamente puede aplicarse a todas las cepas, ya que existen algunas, como la cepa Wa, cuya entrada es NA-resistente. Incluso existen cepas, tanto NA-sensibles (por ejemplo TFR41) como NA-resistentes (por ejemplo UK), cuya entrada es independiente de las integrinas (Graham *et al.*, 2003) (figura 6).

No se conoce con exactitud el mecanismo por el cual los rotavirus entran a la célula durante la infección. Sin embargo, la endocitosis a compartimentos celulares parece ser el mecanismo principal que utilizan los virus no envueltos para entrar a la célula. Las principales vías endocíticas celulares que utilizan los virus para entrar a la célula son: la vía dependiente de clatrina, la vía dependiente de caveolina, las vías independientes de clatrina y caveolina en las que se incluye la recientemente descubierta y aún poco caracterizada vía dependiente de flotilina (figura 7) (Sieczkarski y Whittaker, 2002).

Las Vías Endocíticas Celulares

La Vía Endocítica Dependiente de Clatrina

La vía endocítica mediada por clatrina fue una de las primeras vías estudiadas y, por lo tanto, es la vía más caracterizada. Esta vía se puede ver como una colección de vías endocíticas relacionadas, de manera cercana, por su requerimiento de cubiertas formadas por la proteína clatrina (Schmid y McMahon, 2007). Aproximadamente 150 proteínas diferentes se han asociado con esta vía, de las que sólo de algunas se sabe su función (Kumari, *et al.*, 2010). Algunas de estas proteínas accesorias y adaptadoras regulan los sitios de la membrana plasmática (ricos en fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) que se van a internalizar al coordinar la nucleación de clatrina y así formar la cubierta (Schmid *et al.*, 2006).

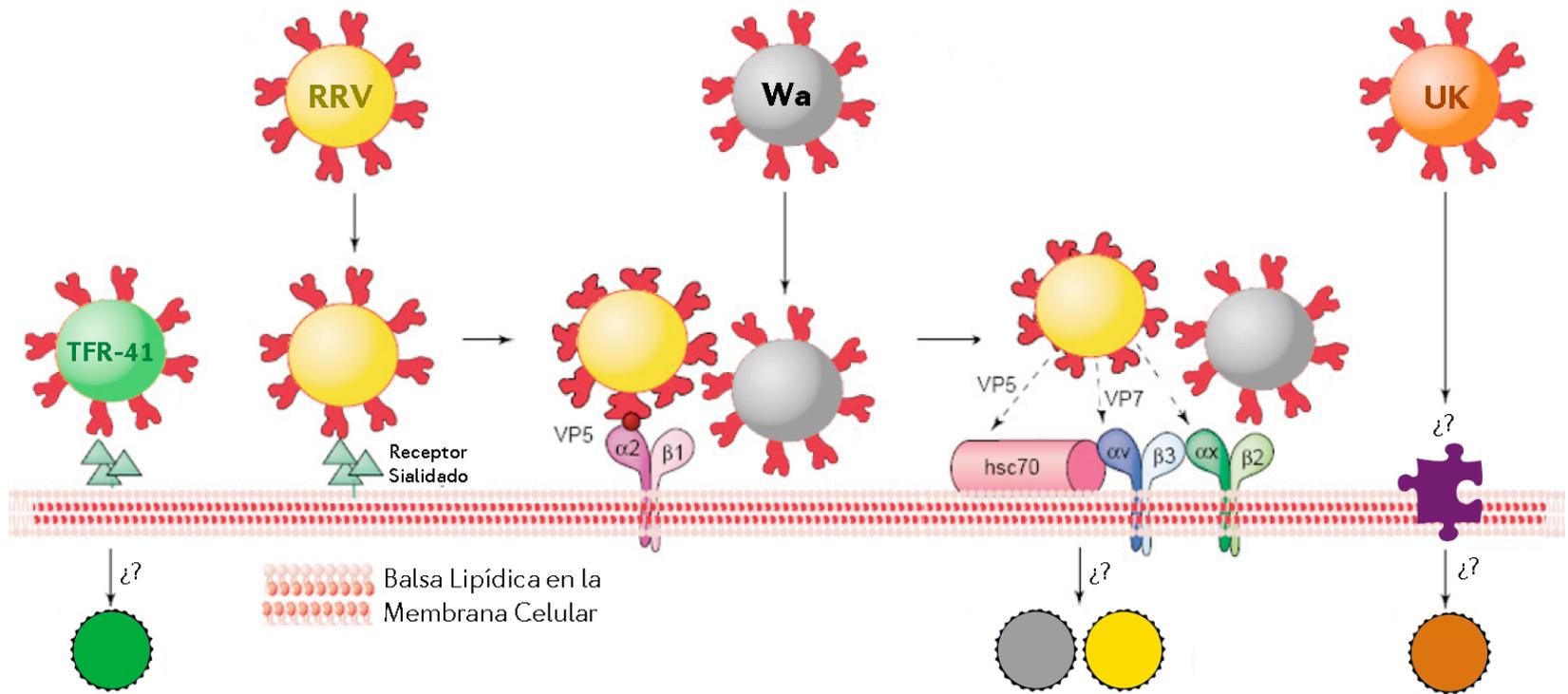


Figura 6. El modelo gráfico del mecanismo de entrada de las cepas RRV, Wa, TRF41 y UK. Existe una gran variedad entre los requerimientos para la entrada a la célula de las diferentes cepas de rotavirus. Algunas cepas de rotavirus, como Wa (gris), son NA-resistentes y su entrada es dependiente de integrinas. Otras, como la cepa TFR41 (verde) son NA-sensibles y su entrada es independiente de integrinas. Existen también cepas, como UK (naranja), que son NA-resistentes y su entrada es independiente de integrinas. La cepa RRV se ilustra de color amarillo.

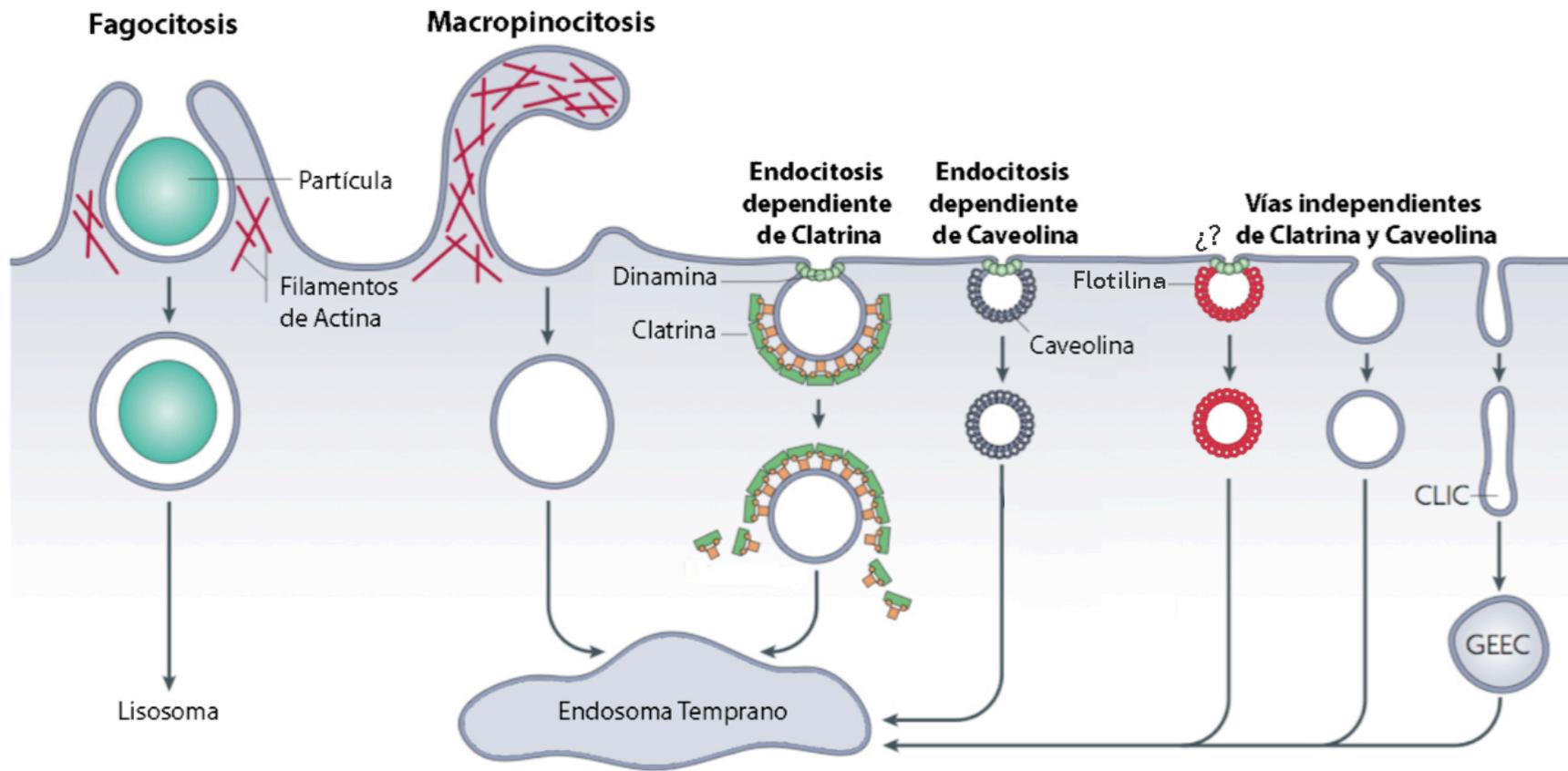


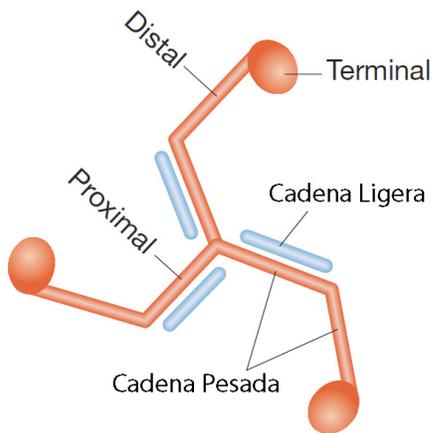
Figura 7. Las principales vías endocíticas celulares. Muchos virus son capaces de utilizar las vías endocíticas celulares para entrar a la célula durante una infección (Mayor y Pagano, 2007).

La cubierta de clatrina es un arreglo tridimensional formado por varios trisqueles (figura geométrica helicoidal con tres piernas unidas en un punto central). Cada trisquel está formado por 3 cadenas pesadas de clatrina (190 kDa) y por tres cadenas ligeras de clatrina (25-29 kDa). A su vez, cada “pierna” del trisquel está conformada por una cadena pesada y una cadena ligera unidas fuertemente cerca del vértice del trisquel (Ter Haar *et al.*, 1998). Estas cubiertas son capaces de envolver vesículas endocíticas de 100-200nm de diámetro (Kumari, *et al.*, 2010) (figura 8).

El ensamblaje de la cubierta de clatrina se estabiliza por proteínas adaptadoras como, AP180/CALM, que se unen tanto a clatrina como a la proteína adaptadora-2 (AP2), que a su vez también se une a clatrina (Young, 2007). Posteriormente se reclutan varias proteínas accesorias que se unen a AP2 y que facilitan: la unión con el cargo que se va a internalizar, la polimerización de la clatrina y la curvatura de la membrana (Kumari, *et al.*, 2010). La proteína Eps15 funciona como andamio de la estructuras de AP2, permitiendo su formación y su estabilidad (Doherty y McMahon, 2009). La polimerización de clatrina por sí sola es capaz de curvar la membrana y de acercar ambos extremos de la membrana que forma la vesícula y así formar un cuello delgado. Además, proteínas como la Eps15 son capaces de unirse a la membrana deformándola y facilitar este proceso (Hinrichsen *et al.*, 2006). Otras proteínas accesorias son capaces de unir a clatrina y AP2 estabilizando la curvatura de la membrana, y también reclutan a la proteína dinamina. La dinamina es una GTPasa que forma un polímero helicoidal (Chapie *et al.*, 2010; Ford *et al.*, 2011) alrededor del cuello de la vesícula endocítica que al hidrolizar GTP es capaz de escindirla al interior de la célula (Taylor *et al.*, 2011).

La mayoría de los cargos que se internalizan por esta vía tienen el motivo YXXF (Y representa Tirosina, X representa a cualquier aminoácido y F representa a un residuo grande e hidrofóbico) y al motivo [D/E]XXXXL[L/I], el cual reconoce AP2 y otras proteínas accesorias (Edeling *et al.*, 2006). Algunos de los cargos que se internalizan por esta vía son el receptor de transferrina y la toxina de ántrax (Doherty y McMahon, 2009). Algunos de los virus que utilizan la vía

a)



b)

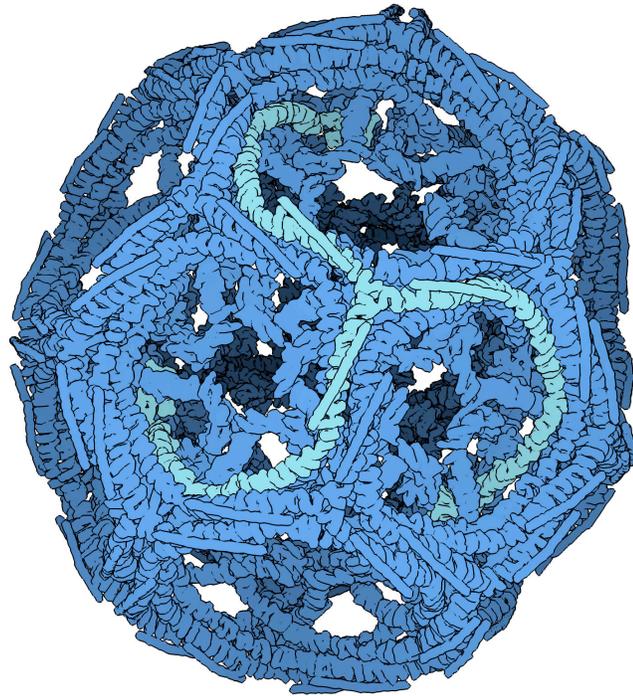


Figura 8. Una ilustración de la estructura del trisquel de clatrina y de la jaula de clatrina. a) Representación gráfica del trisquel de clatrina mostrando las cadenas pesadas de naranja y las cadenas ligeras de azul. A su vez, se señalan los dominios terminales, distales y proximales de la cadena pesada (modificada de Puertollano, 2004). **b)** Los trisqueles de clatrina se polimerizan formando una jaula como la de la ilustración. En azul turquesa claro, en el centro de la ilustración, se resalta uno de los trisqueles de clatrina (modificada de http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb88_1.html).

endocítica mediada por clatrina en su entrada a la célula son: el virus de Influenza A (Chen y Zhuang, 2008), el virus del dengue, los adenovirus 2 y 5 (Mercer *et al.*, 2010), el virus de la estomatitis vesicular (Johannsdottir *et al.*, 2009), el rinovirus humano del grupo menor 2 (Snyers *et al.*, 2003) el virus del bosque de Semliki (Helenius *et al.*, 1980), los reovirus (Danthi *et al.*, 2010) y el virus de la hepatitis C (Blanchard *et al.*, 2006), entre otros.

La Vía Endocítica Dependiente de Caveolina

En esta vía endocítica participan unas estructuras celulares llamadas caveolas. Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática con un diámetro de 60-80 nm que tienen una cubierta estriada en forma de espiral compuesta por la proteína caveolina (Stan, 2002; Rothberg *et al.*, 1992). Hay tres subtipos de proteínas caveolinas: Las caveolina-1 y caveolina-2 son comunes en las células no musculares, mientras que la caveolina-3 se halla en músculo esquelético y en algunas células de músculo liso (Parton y Simons, 2007). Las caveolinas tienen un dominio de pasador hidrofóbico que se inserta en la membrana (McMahon y Gallop, 2005). Las caveolinas-1 y caveolinas-2 son capaces de polimerizar en membranas y esto podría provocar curvatura en la membrana (figura 9). La densidad y el número de caveolas correlaciona con la expresión de caveolina de la célula (Kalia *et al.*, 2006). Cada caveola tiene entre 100 y 200 moléculas de caveolina (Pelkmans y Zerial, 2005). La GTPasa dinamina también es la encargada de escindir las vesículas de esta vía endocítica (Henley *et al.*, 1998).

En las caveolas se encuentra una mayor concentración de lípidos como el colesterol y los esfingolípidos. La formación de estas estructuras depende del colesterol y cuando se retira éste de la membrana plasmática se desensamblan lo que aumenta la movilidad de caveolina-1 (Rothberg *et al.*, 1992). La caveolina interacciona de manera directa con el colesterol en una proporción 1:1. Las caveolas se encuentran en altas concentraciones en algunos tipos celulares como

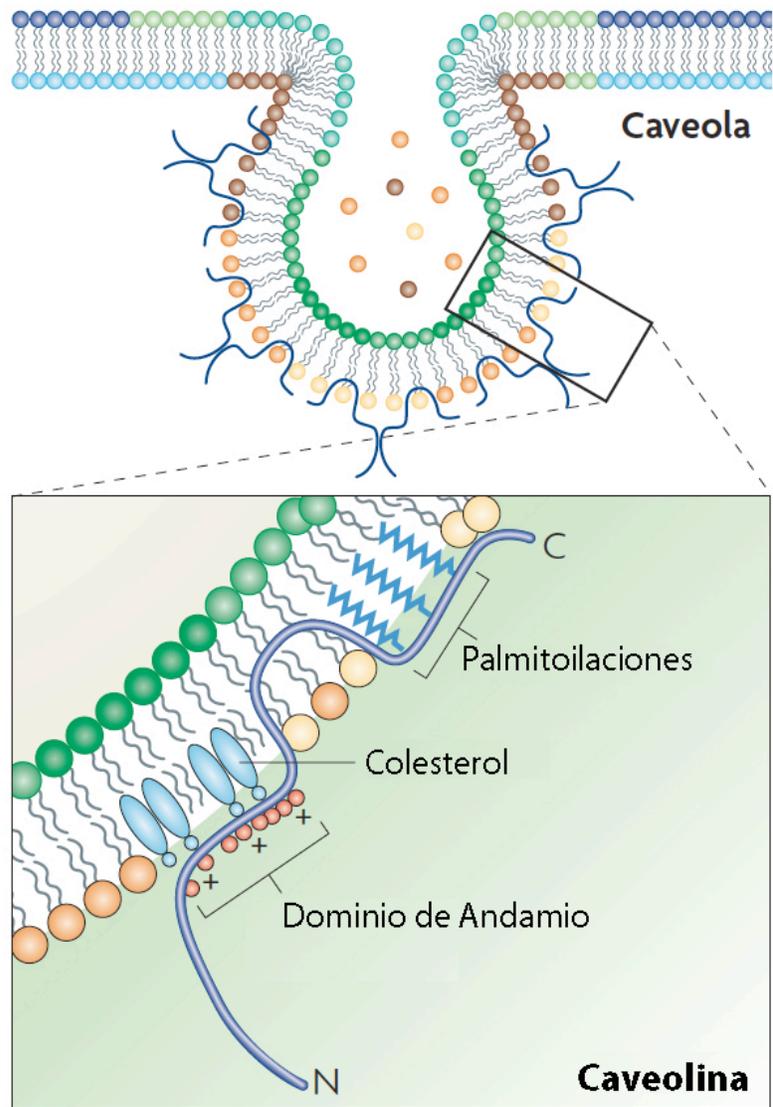


Figura 9. Las vesículas endocíticas cubiertas de caveolina. La caveolina se inserta en la membrana celular de manera en la que su extremo amino y su carboxilo están expuestos en el citosol, mientras que un dominio de “hairpin” se introduce en la membrana celular. Esta proteína también tiene un dominio de andamio, el cual se encuentra enriquecido con cargas positivas que posiblemente interaccionan con el colesterol, lípido que se encuentra enriquecido en los caveosomas. El extremo carboxilo terminal esta modificado con palmitoilaciones que se insertan en la membrana lipídica (modificada de Parton y Simons, 2007).

son los adipositos, las células endoteliales y las células musculares, mientras que sólo hay bajas concentraciones en los hepatocitos y prácticamente se encuentran ausentes en las neuronas y en los linfocitos (Drab *et al.*, 2001; Lamaze *et al.*, 2001; Vainio *et al.*, 2002). Si se sobreexpresan las caveolinas en células deficientes de éstas, se induce la formación *de novo* de caveolas (Vogel *et al.*, 1998; Fra *et al.*, 1995). Algunas de las moléculas que se internalizan por esta vía son la albúmina (Schnitzer *et al.*, 1994), la toxina del tétanos (Herrerros *et al.*, 2001) y la toxina de cólera (Shogomori y Futerman, 2001). También algunos virus como el poliomavirus de ratón (mPy) (Mercer *et al.*, 2010) y el papillomavirus humano del tipo 31 (Smith *et al.*, 2007).

La Vía Endocítica Dependiente de Flotilina

Recientemente se ha empezado a describir una vía endocítica que es dependiente de la proteína flotilina y de la cual existen dos isoformas: la flotilina-1 y la flotilina-2 (Babuke y Tikkanen, 2007). Esta proteína se encuentra en la superficie de varias líneas celulares formando microdominios en la membrana plasmática los cuales contienen aproximadamente 95 copias de cada isoforma (Frick *et al.*, 2007). Estos dominios son morfológicamente similares a las caveolas y se conservan en células que no expresan caveolina-1 (Hansel y Nichols, 2009). También se observó que la flotilina-1 y la caveolina-1 no colocalizan, aunque estas proteínas se sitúen en estructuras similares (Morrow *et al.*, 2002; Pagano *et al.*, 2005). Cuando se coexpresan la flotilina-1 y la flotilina-2 se generan nuevos dominios de membrana positivos a ambas isoformas de flotilina de manera dosis dependiente (Frick *et al.*, 2007). La participación de la GTPasa dinamina en esta vía endocítica todavía no es clara, ya que existen reportes experimentales en los que se caracteriza esta vía como independiente de dinamina (Kirkham *et al.*, 2005; Lamaze *et al.*, 2001; Naslavsky *et al.*, 2004) y en otros como dependiente de dinamina (Aït-Slimane *et al.*, 2009; Payne *et al.*, 2007). Aunque estos resultados pudieran significar que la flotilina participa en varias vías endocíticas, tanto dependientes como independientes a dinamina.

Hasta el momento se conocen pocos cargos que utilizan esta vía endocítica para entrar a la célula: la proteína anclada a glucosilfofostatidilinositol (GPI-AP) CD59 (Glebov *et al.*, 2006; Aït-Slimane *et al.*, 2009), el transportador de dopamina (DAT) (Cremona *et al.*, 2011) y la proteína transmembranal Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) (Ge *et al.*, 2011). Hasta el momento, no se ha reportado ningún virus que utilice esta vía durante su entrada a la célula.

La Inhibición de las Vías Endocíticas Celulares

Uno de las maneras de determinar si un virus utiliza cierta vía endocítica durante su entrada es la de infectar células con una vía endocítica inhibida y ver si se disminuye su infección. Para inhibir las vías endocíticas celulares se pueden utilizar distintos métodos, como la expresión de proteínas mutantes dominantes negativas, siRNAs específicos para inhibir la expresión de proteínas esenciales de cada vía o utilizar tratamientos químicos inhibitorios.

La Expresión de Proteínas Mutantes Dominantes Negativas

Una de las maneras de inhibir las diferentes vías endocíticas es expresando proteínas mutantes dominantes negativas de las proteínas esenciales de cada una de estas vías. Las proteínas mutantes dominantes negativas inhiben parcial o totalmente la función de la proteína que codifica el alelo silvestre, por lo que se puede analizar la función de éstas últimas en la célula viva sin la necesidad de construir mutantes homocigas nulas. Existen varias proteínas mutantes dominantes que se pueden utilizar para analizar las vías endocíticas: la mutante negativa Eps15mut es una mutante por delección de Eps15 (proteína accesoria de la vía endocíticas dependiente de clatrina esencial para la estabilización de AP2 y de la formación de las jaulas de clatrina) inhibe la vía endocíticas dependiente de clatrina. La mutante negativa Cav1-mut es una mutante por delección de caveolina-1 a la que le faltan un fragmento que va del residuo 1 al 81 y las

mutantes negativas Cav-3KSY y Cav-3DGV tienen truncadas el amino terminal. Todas estas bloquean la vía endocítica dependiente de caveolina. Por último, la proteína mutante negativa dominante DynK44A tiene una mutación puntual en el dominio de GTPasa lo que la hace disfuncional y por esta razón bloquea todas las vías endocíticas dependientes de dinamina.

El Silenciamiento por Medio de siRNA

Las células eucariotas tienen una vía llamada interferencia por RNA (RNAi), con la que por medio de RNA pequeños de interferencia específicos se pueden degradar RNA mensajeros complementarios disminuyendo así la expresión específica de proteínas (Elbashir *et al.*, 2001). Esta vía se activa por RNA de doble cadena, de cadena larga, los cuales se cortan en RNA pequeños, conocidos como siRNAs (21-23 nucleótidos) por medio de la proteína Dicer (Bernstein *et al.*, 2001). Se puede saltar este paso, de manera artificial, al sintetizar siRNAs específicos e introducirlos a la célula. Los siRNAs en el citoplasma se unen a un complejo proteico llamado el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Ahí, la proteína argonauta 2, desenrolla el siRNA permitiendo la degradación del RNA codificante pero manteniendo la cadena antisentido unida activando a RISC (Matranga *et al.*, 2005). El RISC activado degrada de manera dirigida los mRNAs con secuencia complementaria al fragmento de RNA unido a RISC. Esto permite el silenciamiento de genes de manera específica (figura 10).

Se puede inhibir específicamente las vías endocíticas utilizando siRNAs dirigidos en contra de los mRNA de las proteínas que se saben son esenciales para su funcionamiento. De este modo, se pueden utilizar siRNAs en contra del mRNA de la clatrina, de la caveolina o de la flotilina para inhibir las vías que dependen de estas proteínas o también, de manera más general, se pueden inhibir las vías endocíticas dependientes de dinamina, utilizando siRNAs en contra de esta GTPasa.

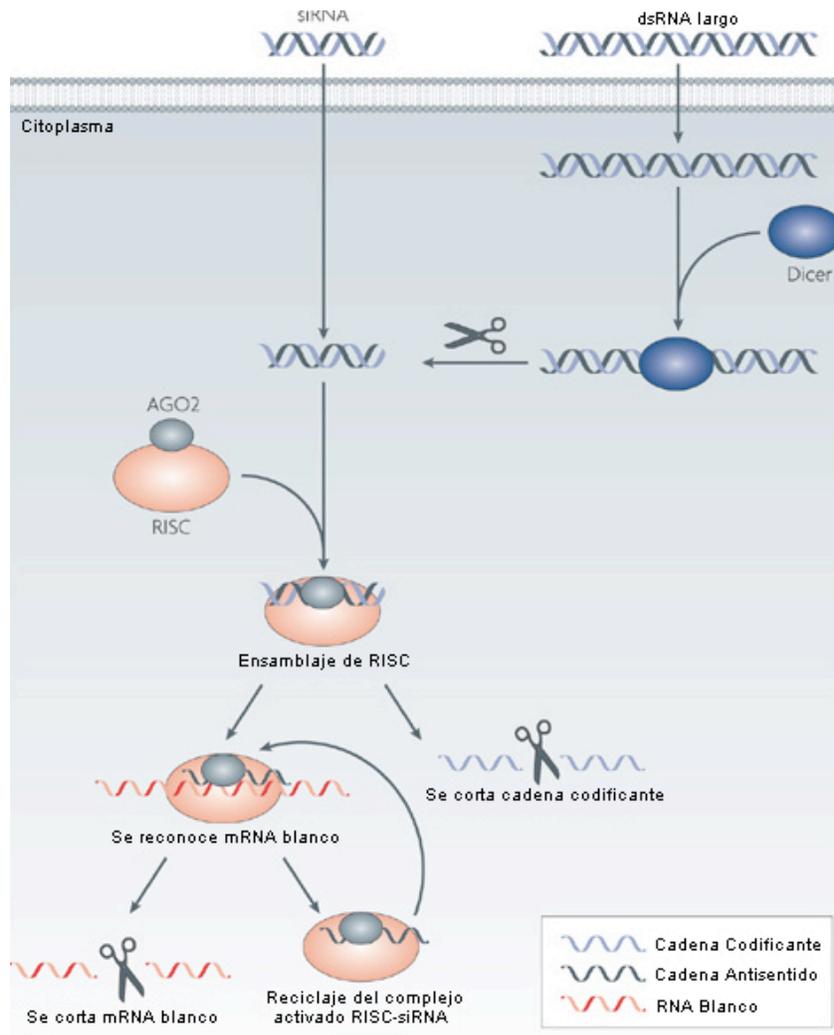


Figura 10. El esquema del mecanismo de acción de los siRNAs. Al introducirse el RNA de doble cadena largo al citoplasma (dsRNA largo), se procesa por la enzima Dicer formando el RNA pequeño interferente (siRNA). También, los siRNAs se pueden introducir de manera directa a la célula reduciendo la posibilidad de una respuesta inmune innata mediada por interferón. Los siRNAs se incorporan al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) lo que provoca la degradación de la cadena codificante por la proteína argonata 2 (AGO2). El complejo RISC-siRNA activado, busca y degrada los mRNAs que contengan la secuencia complementaria al siRNA. Esto provoca que se disminuya drásticamente la traducción de este mRNA lo que provoca un silenciamiento del gen blanco. El complejo RISC-siRNA se puede reciclar y degradar mas mRNAs blancos (modificada de Whitehead *et al.*, 2009).

Los Tratamientos Químicos

Otra manera de inhibir las vías endocíticas es por medio de tratamientos químicos (figura 11). Para inhibir la vía endocítica dependiente de clatrina se utilizan tratamientos con sacarosa o con clorpromazina. La sacarosa promueve la formación anormal de las cubiertas de clatrina disociándolas de las vesículas de clatrina en la membrana plasmática (Hansen *et al.*, 1993). Mientras que los tratamientos con clorpromazina inducen el ensamblaje de clatrina en las membranas endosomales impidiendo que se formen en la membrana plasmática (Wang *et al.*, 2008). La vía endocítica dependiente de caveolina es también dependiente de los niveles de colesterol ya que las balsas lipídicas están involucradas en la formación de las caveolas por lo que los tratamientos con químicos que interaccionan con el colesterol, como la filipina y la nistatina, o químicos que remueven el colesterol de la membrana como la metil- β -ciclodextrina (M β CD) inhiben esta vía endocítica (Sieczkarski y Whittaker, 2002). Por ultimo, también existe una pequeña molécula permeable a la célula llamada dynasore la cual funciona como inhibidor de la dinamina (Macia *et al.*, 2006; Kirchhausen *et al.*, 2008).

Muchos de los virus que entran por las vías endocíticas celulares necesitan de pHs ácidos para penetrar al interior de la célula y continuar con la infección. El pH ácido provoca de manera directa cambios conformacionales en las proteínas de la cápside de algunos virus que activan su capacidad de penetrar la membrana endosomal hacia el interior de la célula. El virus de influenza (Stegmann *et al.*, 1987; Weber *et al.*, 1994) y el virus de la rabia (Gaudin *et al.*, 1993; Gaudin *et al.*, 1999) son algunos ejemplos de virus que requieren de este proceso durante su infección. En cambio algunos virus, como el virus del Ebola (Chandran *et al.*, 2005), el coronavirus SARS (Simmons *et al.*, 2005) y los reovirus de mamíferos (Ebert *et al.*, 2002), no necesitan del pH ácido directamente si no que requieren ser procesados por proteasas dependientes de pH ácido, como las cathepsinas L y H, para activar su penetración hacia el

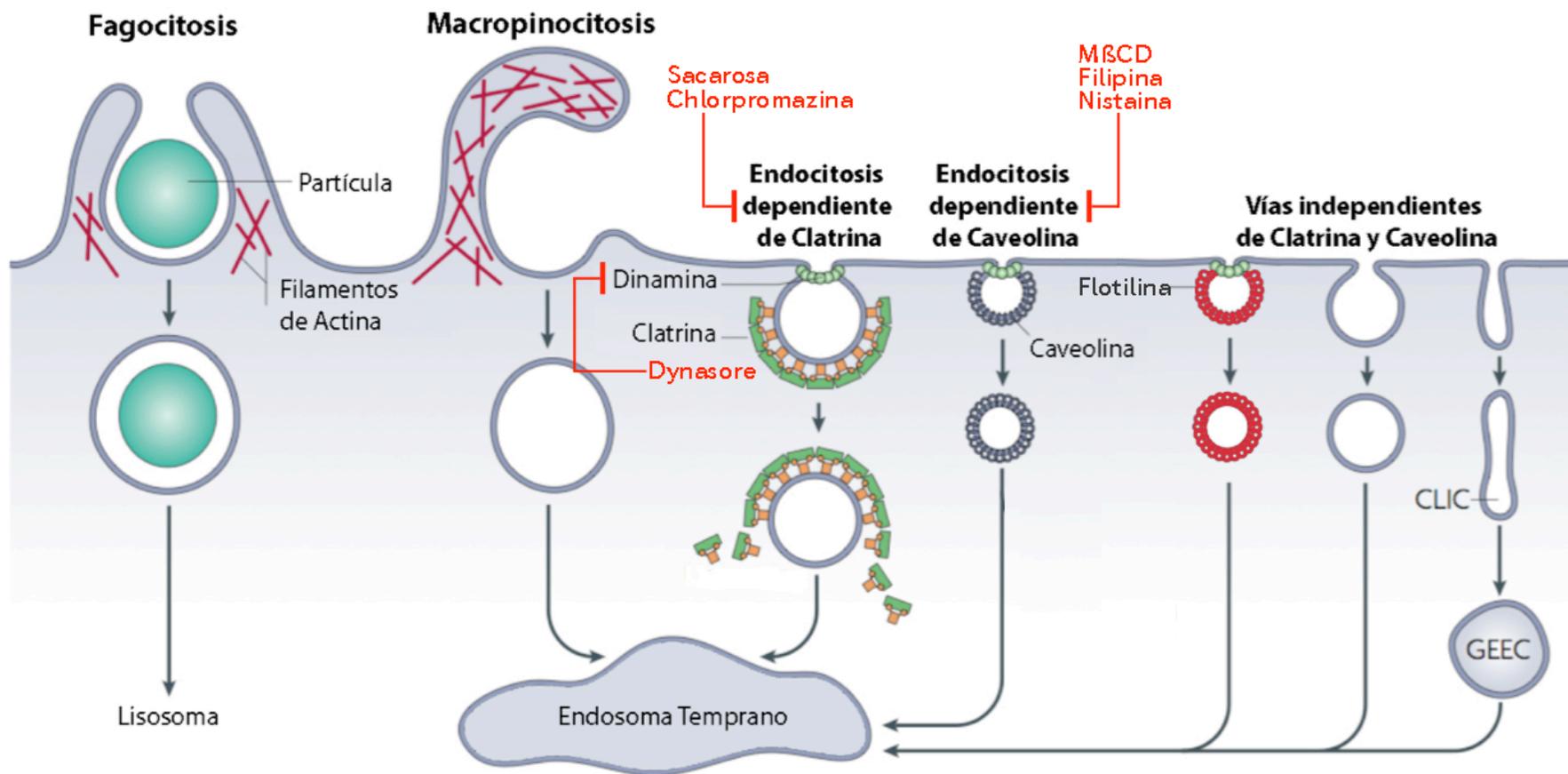


Figura 11. Los Tratamientos químicos que inhiben vías endocíticas celulares. La vía endocítica dependiente de clatrina se puede inhibir con tratamientos con sacarosa y clorpromazina. La vía endocítica dependiente de caveolina se puede inhibir con fármacos que remueven o que se unen al colesterol como nistaina, filipina o MβCD. La actividad de la GTPasa dinamina se puede inhibir con Dynasore.

citoplasma. Para determinar si los virus necesitan de la acidificación endosomal durante algún punto de su infección, se pueden utilizar varios fármacos dentro de los que se encuentran la bafilomicina A1, la Concanamicina A, el cloruro de amonio y la cloroquina. La bafilomicina A1 (Bowman *et al.*, 1988) y la Concanamicina A (Drose *et al.*, 1993) son inhibidores específicos de la ATPasa-V, bloqueando el bombeo de protones hacia el interior de los endosomas (Huss y Wiczorek, 2009). El método de acción de la cloroquina y del cloruro de amonio es distinto (Ohkuma *et al.*, 1978; Ferreira *et al.*, 2000). Estos fármacos, en su forma neutra, son capaces de entrar a los endosomas por difusión simple. Ya dentro, estas moléculas se protonan, subiendo el pH endosomal de estos organelos.

Muchos de estos tratamientos, aunque disminuyen drásticamente las vías endocíticas, pueden tener efectos secundarios.

ANTECEDENTES

La Entrada de Rotavirus a la Célula

La infección de la cepa RRV (aislada del mono *Rhesus*) ha sido la más estudiada por lo que su entrada a la célula se conoce con un mayor detalle. Existe evidencia experimental de que esta cepa utiliza una vía endocítica independiente de clatrina y de caveolina, que parece ser dependiente de dinamina ya que su entrada a la línea celular MA104 se inhibe cuando se utiliza la mutante dominante negativa de dinamina DynK44A ((Sánchez-San Matín *et al.*, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2010). Sin embargo, si se utiliza Dynasore, inhibidor específico de esta GTPasa, la entrada no se afecta (Wolf *et al.*, 2010). La disminución de la infección por DynK44A podría deberse a un efecto secundario que se genera por la inhibición prolongada de esta vía. En cambio, las cepas TFR41 (origen porcino), UK (origen bovino) y Wa (origen humano) utilizan la vía endocítica dependiente de clatrina para entrar a la célula y su infección disminuye con inhibidores de acidificación endosomal (figura 12). La velocidad de entrada de estas cepas también varía: la cepa RRV es la más rápida, ya que su entrada tiene un tiempo medio de 30 min, mientras que el tiempo de entrada de TFR-41 es de 60 minutos y el de Wa de 90 minutos. La cepa UK es la más lenta en entrar ya que lo hace en más de 90 minutos. Estas diferencias en la cinética de entrada de las diferentes cepas podría deberse al uso diferencial de receptores o en el caso de RRV al uso de vías endocíticas distintas (Gutiérrez *et al.*, 2010). Todos estos resultados se obtuvieron al infectar la línea celular MA104.

Por otra parte, cuando las células se tratan con metil- β -ciclodextrina, químico que secuestra el colesterol de las membranas, la infección por rotavirus disminuye drásticamente (Guerrero *et al.*, 2000b). El colesterol es un lípido que tiene varias funciones dentro de la célula, entre las que se encuentran la integridad de las balsas lipídicas en la membrana celular y de la membrana celular en general. A su vez se observó que después de infectar con la cepa RRV,

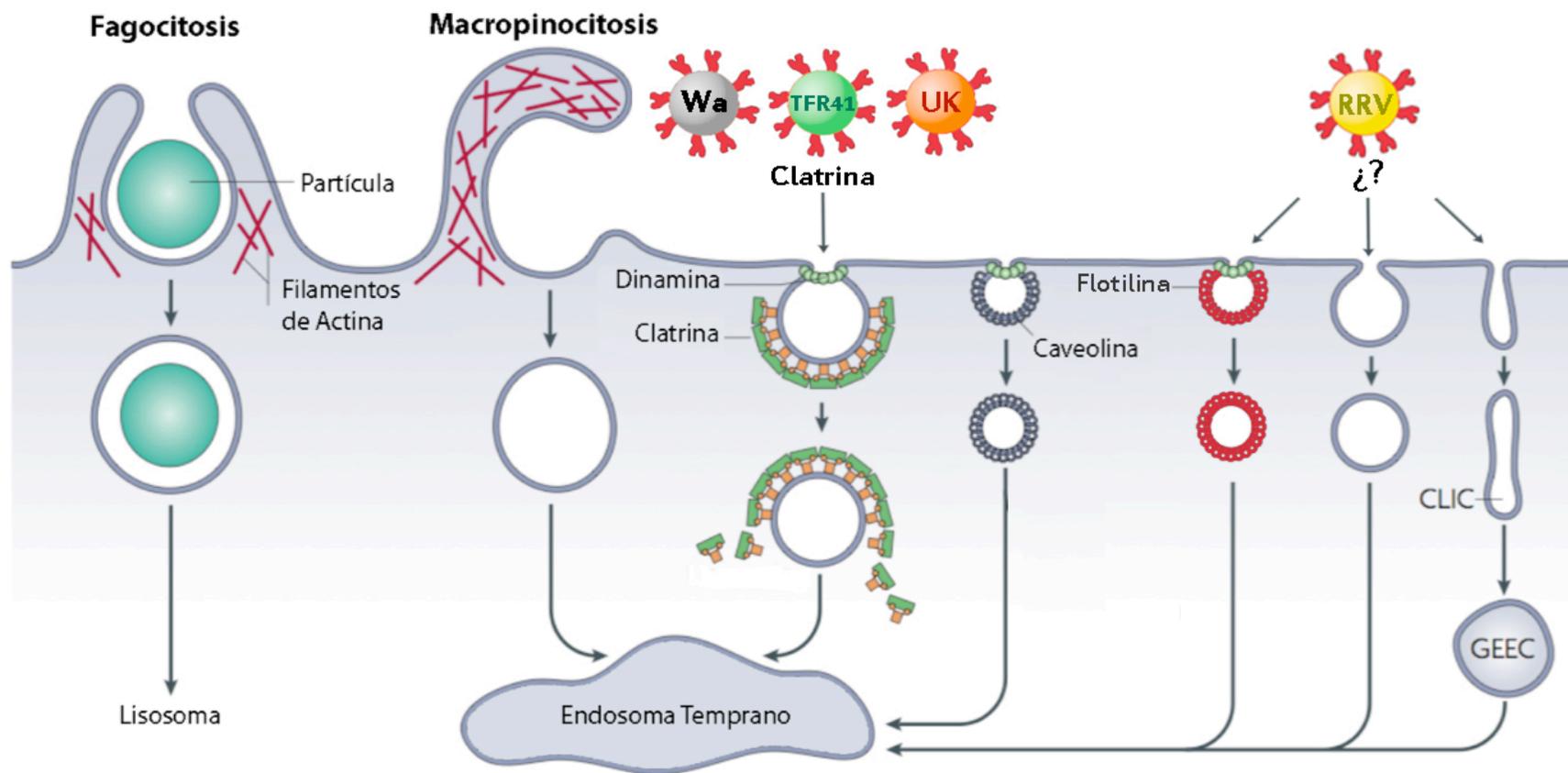


Figura 12. Las vías endocíticas celulares utilizadas por las cepas de rotavirus: Wa, TFR41, UK y RRV, en su entrada a la célula (MA104) durante una infección (Modificada de Mayor y Pagano, 2007).

los viriones, también están asociados a las balsas lipídicas (Isa *et al.*, 2004). Los receptores implicados en la entrada de la partícula infecciosa se encontraron agrupados en las balsas lipídicas lo que llevó a pensar que la función de estas balsas es mantener asociados espacialmente a estos receptores y facilitar la interacción eficiente del rotavirus con la célula y su consiguiente entrada (Isa *et al.*, 2004). La dependencia en la entrada viral a la concentración del colesterol de la membrana plasmática parece ser una característica general de todas las cepas de rotavirus.

Los Rotavirus Porcinos

Los rotavirus infectan a muchas especies animales dentro de las que se encuentran los puercos. Las cepas de rotavirus YM, OSU y TFR41 son de origen porcino y su entrada es NA-sensible, tanto en su infección en MA104 (Ciarlet y Estes, 1999; Ciarlet *et al.*, 2002; Mendez *et al.*, 1999) como en IPEC-1 (línea celular de intestino de cerdo recién nacido) (Cevallos, Tesis de Licenciatura, 2010). La cepa porcina OSU utiliza el gangliósido GM3, u otros gangliósidos monosializados, como receptores durante la infección en células MA104 (Rolsma *et al.*, 1998; Rolsma *et al.*, 1994). Además, la entrada de la cepa TFR41 es independiente de integrinas, ya que su infectividad no disminuye cuando se tratan células MA104 con anticuerpos monoclonales en contra de la integrina $\alpha_v\beta_3$ y en contra de las cadenas de las integrinas β_2 y α_2 (Graham *et al.*, 2003). La infección de estas cepas en células IPEC-1, no polarizadas, disminuye al bajar la concentración de colesterol por medio de tratamientos con MBCD. También se observaron disminuciones en la infección pre-tratando las células con sacarosa (inhibidor de la vía endocítica dependiente de clatrina al favorecer la formación de jaulas de clatrina más pequeñas e infuncionales) lo que sugiere que estas cepas entran a IPEC-1 no polarizadas por la vía endocítica dependiente de clatrina (Cevallos, Tesis de Licenciatura, 2010).

La Línea Celular IPEC-J2

Aunque *in vivo* los rotavirus infectan los enterocitos maduros, la mayoría de los experimentos sobre la infección de rotavirus se han realizado en la línea celular epitelial de riñón de mono MA104, en la línea celular de carcinoma de colon humano Caco-2 o en la línea de riñón de perro MDCK. Estas líneas celulares, aunque no son modelos cercanos a lo que ocurre *in vivo*, se han utilizado principalmente por ser altamente permisivas y susceptibles a la infección por rotavirus y por la facilidad y los bajos requerimientos de su cultivo celular.

Los virus son capaces de utilizar diferentes receptores celulares y diferentes vías endocíticas durante su entrada al infectar diferentes tipos celulares. Por ejemplo, estudios enfocados en la entrada del virus de vaccinia sugieren que el virus utiliza diferentes receptores celulares y vías endocíticas durante su entrada en los diferentes tipos celulares (Whitbeck et al., 2009). También SV40, virus que, como se mencionó anteriormente, entra a la célula por la vía endocítica dependiente de caveolina, al infectar la línea celular deficiente en caveolina (hepatoma humano 7), utiliza una vía endocítica independiente de caveolina y clatrina que todavía no se ha determinado (Damm et al., 2005). Otro ejemplo es el del citomegalovirus humano que utiliza diferentes receptores celulares cuando infecta a los fibroblastos que cuando infecta a las células epiteliales o las endoteliales (Ryckman et al., 2008). Estos ejemplos nos muestran la diversidad de las estrategias infecciosas que puede utilizar una misma especie viral, de acuerdo el tipo celular que infecte, lo cual pudiera provocar la caracterización de una entrada viral que se alejara a la que ocurre *in vivo*. Por todo esto es importante estudiar la infección viral en modelos que se aproximen lo mas posible a lo que ocurre de manera natural.

La línea celular IPEC-J2 es una línea no transformada intestinal derivada de células epiteliales del yeyuno que se obtuvieron de puercos neonatos sin amamantar (Rhoads, J. M. et al., 1994). Esta línea es un modelo especialmente útil ya que cuando se siembran filtros cubiertos de colágeno con medio

adicionado con dexametasona o con hidrocortisona (un glucocorticoide natural menos activo que la dexametasona) forma una monocapa polarizada, con un lado apical con microvellosidades, propiedades que lo hacen similar al epitelio intestinal normal (Gonzalez-Vallina *et al.*, 1996). Al polarizarse, se forman uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas (figura 13) (Schierack, P. *et al.*, 2006) que impiden el paso de moléculas entre la cara apical y basal y se aumenta la resistencia eléctrica transepitelial (TER).

Las células IPEC-J2 expresan las proteínas de uniones estrechas claudinas 3 y 4 y ocludina en su membrana basolateral (figura 14) de manera similar al epitelio del yeyuno normal (Schierack, P. *et al.*, 2006). Todos los genes que están reportados que se expresan en células de epitelio intestinal, también se expresan en esta línea celular. Entre estos genes se encuentran el de la mucina 1, ICAM1, CD58, CD47, citoqueratinas y vilina (Mariani, V. *et al.*, 2009).

Por todo lo anterior, la línea celular IPEC-J2 es un modelo que es muy similar a la fisiología normal de una célula intestinal epitelial y se utiliza principalmente para estudiar eventos fisiológicos y bioquímicos del epitelio intestinal (Kandil, H. M., *et al.*, 1995; Rhoads, J. M., *et al.*, 1997) y en estudios de interacciones huésped-patógeno de diferentes bacterias como *Salmonella* Typhimurium DT104 (Brown, D. y Price, L., 2007), *Lactobacillus reuteri* (Skjolaas, K. A., *et al.*, 2007) y *Escherichia coli* O157:H7 (Liu, B. *et al.*, 2010). Inclusive hay un artículo en el que se estudia la respuesta inmune innata de la línea celular IPEC-J2 cuando se infecta con rotavirus (Liu, F. *et al.*, 2010).

En conclusión, la línea celular IPEC-J2 representa un modelo mucho más cercano a la fisiología de un enterocito maduro y puede utilizarse para estudiar la infección por rotavirus y así dar resultados mucho más cercanos a lo que ocurre de forma natural durante una infección con rotavirus.

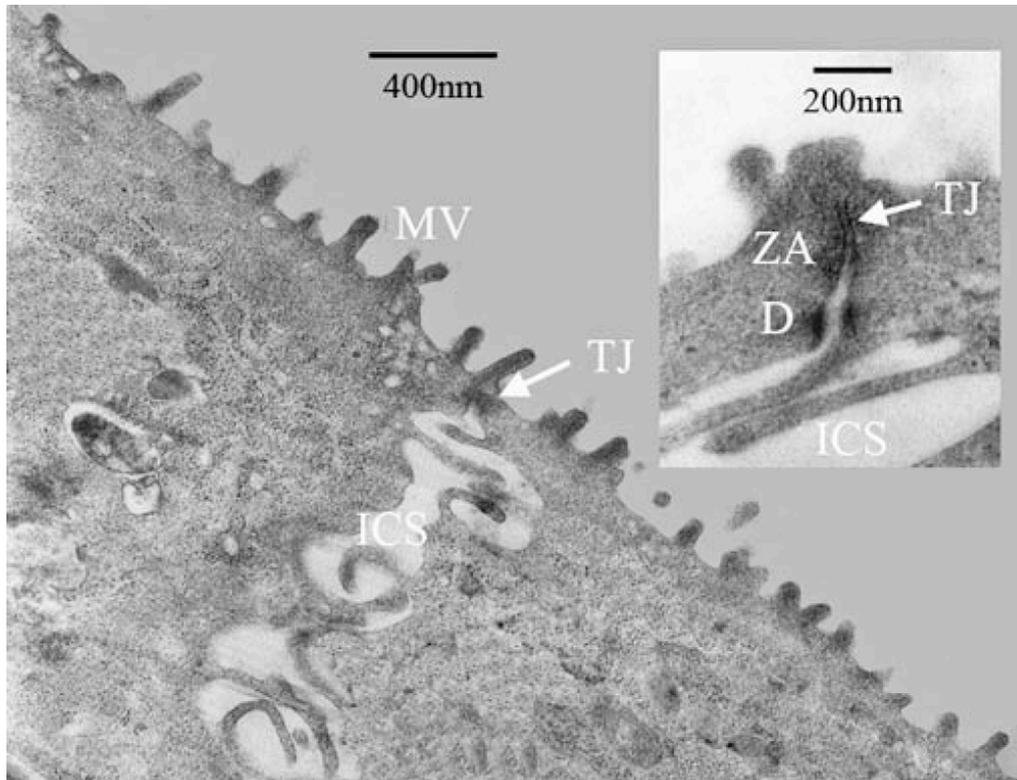


Figura 13. La Microscopía electrónica de una monocapa celular de un cultivo de IPEC-J2 polarizado. Las células se crecieron en un filtro transwell cubierto de colágeno. **MV:** microvellosidades, **TJ:** uniones estrechas, **ICS:** espacio intracelular, **ZA:** uniones adherentes, **D:** desmosomas. Tomada de Schierack *et al.*, 2006.

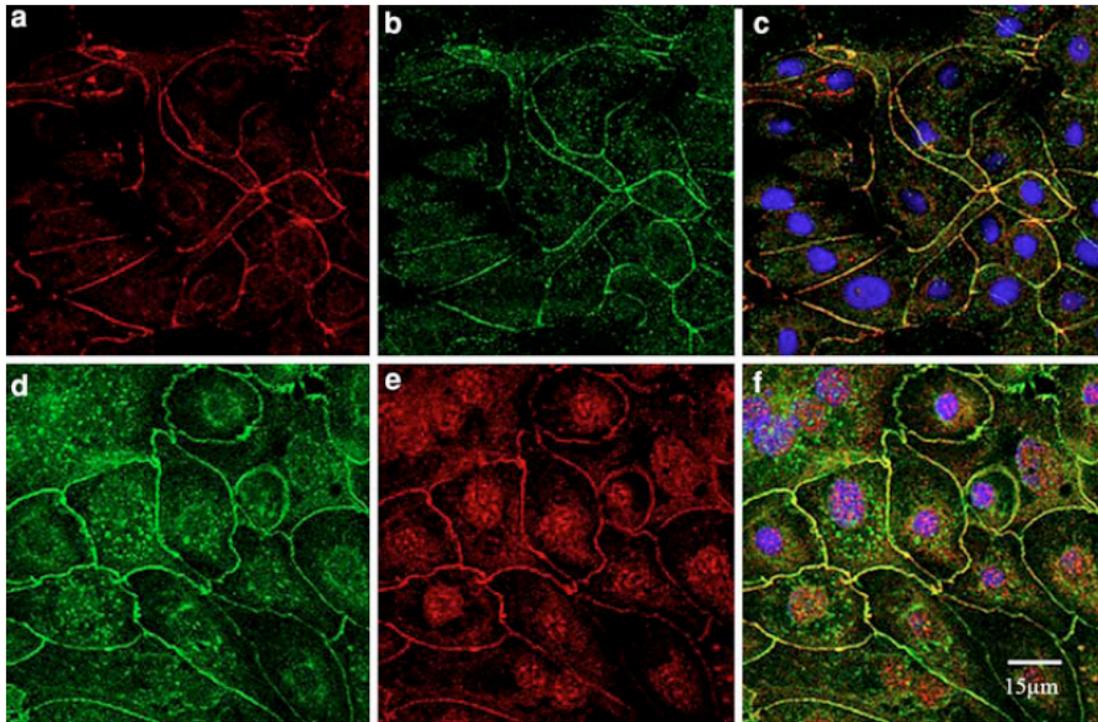


Figura 14. Detección de las uniones estrechas en un cultivo de IPEC-J2. Una monocapa de células IPEC-J2 fue teñida con anticuerpos contra **a:** Claudina-3, **b:** Ocludina, **c:** Merge a+b, **d:** Claudina-4, **e:** Ocludina, **f:** Merge d+e. Los núcleos celulares están teñidos con DAPI. La figura fue tomada de Schierack *et al.*, 2006.

La Infección en Células Polarizadas

Aunque es un modelo de estudio que se asemeja más a las células hospederas en una infección *in vivo*, existen pocos reportes sobre la infección de los rotavirus en células polarizadas. En estas investigaciones se han utilizado principalmente las líneas celulares Caco-2 y MDCK. Las células polarizadas tienen varias características que las hacen distintas a los cultivos celulares no polarizados que se usan convencionalmente para estudiar la infección por los rotavirus (como MA104). Una de las características más notorias es la distribución polarizada de las diferentes proteínas membranales que sirven como receptores para los rotavirus durante su entrada. Un ejemplo de esto es la distribución de las integrinas en la membrana, ya que se localizan exclusivamente en la membrana basolateral de las células polarizadas (Schoenenberger et al., 1994). Esto es importante, ya que los rotavirus interactúan con varias integrinas durante su entrada a la célula. Cuando el virus infecta por la cara apical estos receptores se encuentran debajo de las uniones estrechas celulares y por lo tanto están espacialmente ausentes para que se dé la interacción con el virus de manera inmediata. Por esta distribución heterogénea de los receptores virales de la membrana de las células polarizadas, la membrana apical y la membrana basolateral deberían tener diferentes sensibilidades a la infección por rotavirus. Estas diferencias se han estudiado utilizando diferentes líneas celulares y cepas virales y que han generado resultados contradictorios y conflictivos entre los diferentes trabajos.

En uno de los primeros trabajos (Svensson et al., 1991) en los que se trató este tema, se utilizaron cultivos polarizados de Caco-2 y MDCK para estudiar la infección apical y la basolateral de la cepa RRV. Las células se crecieron sobre filtros *Transwell* con poros de 3.0 μm de diámetro ya que los rotavirus no difunden de manera libre a través de los filtros con poros de diámetro menor. En este trabajo concluyeron que la cepa RRV infecta ambos cultivos celulares con la misma eficiencia tanto la cara basolateral como la cara apical.

En un trabajo posterior se estudió la infección de la cepa RRV (que es

sensible a NA) y la infección de la cepa WC3 (que es resistente a NA) en varias líneas celulares polarizables crecidas en filtros *Transwell* con poros de 0.4 μm de diámetro. Aquí concluyen que las cepas de rotavirus sensibles a NA infectan con mayor eficiencia la cara apical de las células polarizadas, mientras que las cepas de rotavirus resistentes a NA infectan indistintamente ambas caras de las células de los cultivos polarizados (Ciarlet et al., 2001). Ellos atribuyen estas diferencias a que los ácidos siálicos se localizan principalmente en la cara apical de las líneas celulares utilizadas en este estudio, y a que los tratamientos con NA previos a la infección solo disminuyen la infección apical de las cepas NA sensibles. También explican que las células son capaces de atravesar los filtros *Transwell* de 3.0 μm y formar una monocapa polarizada tanto en la cara superior como en la cara inferior de los filtros por lo que en los trabajos anteriores en los que RRV parecía infectar de manera no polarizada en realidad estaba infectando por la cara apical de los cultivos, en ambos casos.

En un estudio reciente (Realpe, et al. 2010) se caracterizó la infección de cultivos polarizados de MDCKII (células epiteliales de riñón canino de Madin-Darby cepa II) por las cepas RRV, TFR-41, UK y Wa. Los resultados mostraron que todas las cepas, sin importar si son sensibles o no a los tratamientos con NA, infectan de manera más eficientemente la cara basolateral de los cultivos polarizados. En este trabajo decidieron utilizar filtros *Transwell* con poros de 3 μm (verificando que no se formara una monocapa en la parte inferior de los filtros) ya que aproximadamente sólo el 0.1% de los virus son capaces de atravesar filtros *Transwell* con poros de 0.4 μm , mientras que aproximadamente el 30% de los virus atraviesan los filtros *Transwell* con poros de 3.0 μm . Tomando en cuenta esto, los resultados sobre la infección por la cara basolateral se ajustaron multiplicando por un factor de 4 lo que mostró de forma cualitativa que las cepas NA-resistentes infectan de 8 a 28 veces más la cara basolateral que la cara apical, mientras que las cepas NA-sensibles infectan solo de 1.5 a 2.5 veces más la cara basolateral.

La vía endocítica utilizada por el virus durante su entrada al infectar cultivos polarizados ha sido menos caracterizada por lo que se tiene poca

información. Cuando la cepa RRV de rotavirus infecta cultivos polarizados MDCKII por la cara apical parece utilizar una vía endocítica independiente de dinamina. La infección del virus disminuye con los tratamientos celulares con inhibidores de la H⁺-ATPasa vacuolar pero este efecto parece no ser por la basificación endosomal ya que otros fármacos que basifican a los endosomas de manera directa no tienen efecto alguno en la infección. Esta disminución parece deberse más bien a la acumulación de Ca²⁺ en los endosomas ya que bajas concentraciones de este anión favorecen la descapsidación del virus (Wolf *et al.*, 2010).

Existen varias hipótesis para explicar por que los rotavirus puedan infectar de manera efectiva ambas caras del cultivo, aunque la infección por la cara basolateral sea la más eficiente: la primera es que todas las moléculas que necesita rotavirus para interactuar y entrar a la célula durante la infección se encuentren tanto en la cara apical como en la basolateral, pero en diferente proporción. La segunda es que el virus interactúe con la cara apical y que esto provoque que se abran las uniones estrechas permitiendo que los receptores post-unión se trasladen de la cara basolateral, a la basal y pueden interactuar con el virus (Realpe, *et al.* 2010). Experimentos de Nava *et al.*, 2004 muestran que VP8* (el producto proteolítico de VP4), por si sola, es capaz de afectar las uniones estrechas provocando una disminución de la resistencia eléctrica transepitelial y lo que permite el paso de las proteínas basolaterales como la integrina $\alpha_v\beta_3$ y la subunidad de integrina β_1 a la cara apical. La tercera es que los rotavirus infecten principalmente en micro lesiones del intestino que expongan la cara basolateral de las células adyacentes a la herida. Por ultimo, la primera infección de los rotavirus pudiera ser por la cara apical de las células directamente pero el virus liberado después de un ciclo infeccioso, pudiera infectar por la cara basolateral ya sea por que se liberó por la cara basolateral o por que se generaron micro lesiones durante el primer ciclo infeccioso que dejaron expuesto el lado basolateral de las células.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Caracterizar la entrada de los rotavirus porcinos en células epiteliales de intestino de puerco IPEC-J2.

Objetivos Particulares

- Polarizar cultivos de IPEC-J2 crecidos en filtros Transwell.
- Comparar la eficiencia de infección de los rotavirus entre la infección por la cara apical y la basal del cultivo polarizado de IPEC-J2.
- Estudiar el efecto de la Neuraminidasa en la infección por rotavirus en ambas caras de los cultivos polarizados de IPEC-J2.
- Probar la sensibilidad a la depleción de colesterol de la membrana en la infección por rotavirus de ambas caras de los cultivos polarizados de IPEC-J2 al tratarlos con M β CD.
- Observar los cambios en la infección al bloquear la vías endocíticas dependientes de clatrina, caveolina, flotilina y/o dinamina en células IPEC-J2 polarizadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células, Medios de Cultivo y Virus: Las células epiteliales de riñón de mono (MA104) se crecieron en Medio Eagle Modificado por Dulbecco reducido en suero (DMEM-RS) (Thermo Scientific), con alta concentración de glucosa suplementado con 3% de suero fetal bovino (FBS). La línea celular de células de intestino de puerco recién nacido (IPEC-J2) la donó el Dr. A. Blikslager, Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University USA. Esta línea celular se creció en medio de Eagle modificado por Dulbecco: Mezcla nutritiva F12 (DMEM/F12)(GIBCO Invitrogen) suplementado con 5% de FBS, con suplemento de medio con insulina-transferrina-selenito de sodio (Sigma) dejando a una concentración final de insulina de 4.2 $\mu\text{g/ml}$, de transferrina de 3.8 $\mu\text{g/ml}$ y de selenio de 5 ng/ml . Por último se suplementa con el factor de crecimiento epidérmico (5 ng/ml), penicilina (50 $\mu\text{g/ml}$) y estreptomycin (4 $\mu\text{g/ml}$). La línea celular se creció en monocapa en frascos para cultivo celular F-75 (Corning), cambiando el medio de cultivo por medio fresco cada segundo día. A la semana aproximadamente, cuando los cultivos alcanzan aproximadamente el 90% de confluencia, los cultivos celulares se lavaron con EDTA (a una concentración de 200 mg/L disuelto en PBS) y se incubaron con una solución de EDTA/tripsina (0.025% de tripsina) a 37 °C hasta que las células se desprendieron de la monocapa (aproximadamente 15 minutos de incubación). Las células se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo y se agregaron 2.5 ml de esta solución celular a un nuevo frasco F-75 donde se llevó a 10 ml de volumen total agregando medio de cultivo fresco. Las células crecieron a 37 °C y con 5% de CO_2 . La cepa de rotavirus porcino YM, se aisló y caracterizó en nuestro laboratorio (Carlos Arias y Susana López, Instituto de Biotecnología UNAM). La cepa de rotavirus humana Wa y la cepa de rotavirus de simio RRV las donó el Dr. H. B. Greenberg (Stanford University, Sanford, CA). Las cepas de rotavirus se crecieron en la línea celular MA104. Las células MA104 crecidas en frasco-F75 o F-150 fueron lavadas dos

veces con medio de Eagle (MEM) y se infectaron con los rotavirus previamente activados con tripsina a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1. Los virus se dejaron absorber durante 1 hora a 37°C. Después de adsorción, inóculo fue retirado y las células lavadas nuevamente 2 veces con el medio MEM. Se agregó medio MEM fresco, y la infección se dejó proceder por 14-16 horas. Las células con el virus se cosecharon mediante un raspador y se congelaron y descongelaron 2 veces. Posteriormente los virus fueron activados por tripsina a 37°C durante 30 minutos (10 µg/ml) e inactivados con inhibidor de tripsina de soya (10 µg/ml).

Polarización de Cultivos de IPEC-J2: Para polarizar células IPEC-J2, estas se crecieron en filtros permeables Transwell (figura 15) de politetrafluoroetileno cubiertos de colágeno con poros de 3.0 µm de diámetro (Transwells, Corning, Costar, USA) con un diámetro del área de cultivo de 24, 12 o 6.5 mm que se agregan a una placa de 6, 12 o 24 pozos respectivamente. Se agregaron 0.1 ml (filtros de 6.5 mm), 0.5 ml (filtros de 12 mm) o 1.5 ml (filtros de 24 mm) de una dilución 1:1 obtenida a partir de un frasco F75 con un cultivo celular confluyente. Se agregan 2.6 ml de medio de cultivo en el pozo y 1.5 ml en el filtro para los filtros de 24 mm de diámetro, 1.5 ml en el pozo y 0.5 ml en el filtro para los de 12 mm y por último para los de 6.5 mm se necesitan 0.6 ml en el pozo y 0.1 ml en el filtro. Se dejaron crecer las células con el medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 5% de FBS, insulina (5 µg/ml), transferrina (5 µg/ml), selenio (5 ng/ml), factor de crecimiento epidérmico (5 µg/l), penicilina (50 µg/ml) y estreptomina (4 µg/ml), hasta que las células llegan a confluencia. Posteriormente, al llegar a confluencia se les cambió el medio de cultivo por DMEM/F12 sin FBS y con una concentración de 10⁻⁷ M de dexametasona (dexametasona soluble en agua para cultivo celular, Sigma-Aldrich). Para comprobar el grado de polarización se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TER) diariamente con un voltímetro epitelial EVOMX (World Precision Instruments). Para poder comparar los valores de las resistencias de los cultivos celulares crecidos en filtros con diferentes áreas se convirtieron los valores de Ohms (Ω) a unidades de resistencia área (Ωcm²). Para hacer esto se multiplica la resistencia por el área afectiva de la membrana. Ya que los filtros son circulares

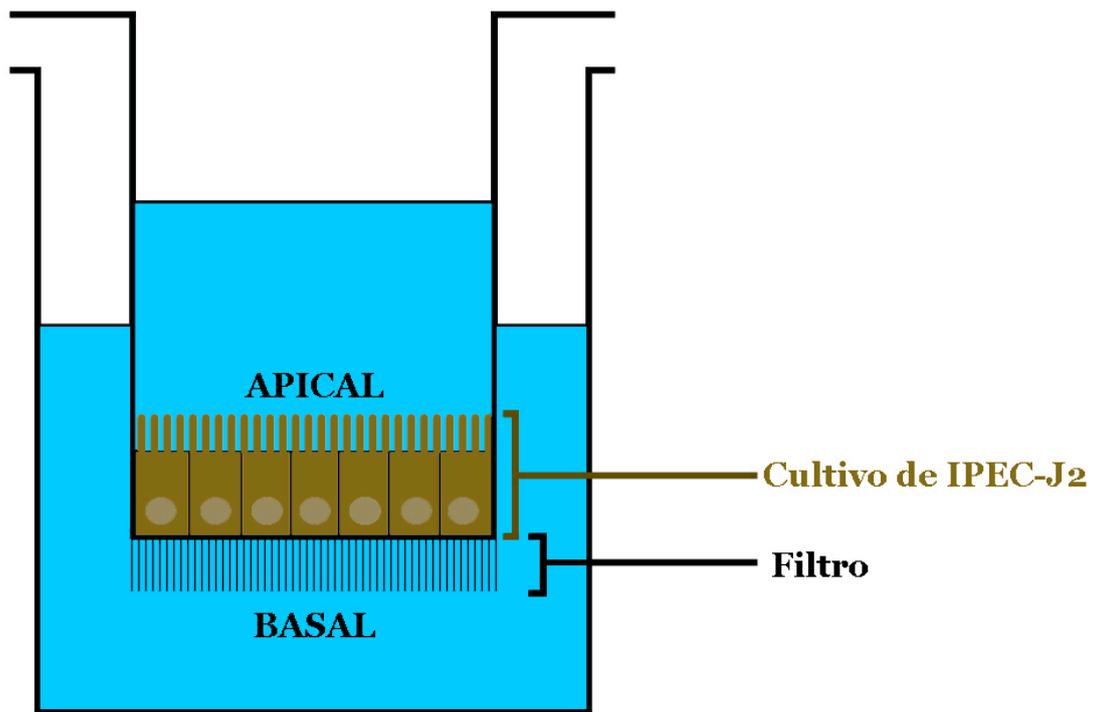


Figura 15. La ilustración de un cultivo de células IPEC-J2 crecidas sobre un filtro Transwell. En esta ilustración se muestra como los filtros Transwell separan la cara apical y la cara basolateral de los cultivos celulares permitiendo experimentar con ellas de manera independiente.

se utiliza la siguiente fórmula: Resistencia $\times (\pi d^2/4)$, tomando la resistencia en Ohms (Ω) y el diámetro en centímetros (cm). Para los experimentos se utilizaron cultivos con una TER mayor a $350 \Omega\text{cm}^2$, la cual se alcanzó aproximadamente entre los 3-5 días de agregar dexametasona.

Protocolo de Preparación de Cultivos en Insertos Transwell para Microscopía Electrónica de Transmisión: Para analizar los cultivos polarizados de IPEC-J2 por microscopia electrónica de transmisión, se crecieron y se polarizaron los cultivos como se describió previamente. Se analizaron cultivos celulares a los que se les había agregado dexametasona durante 3 días y que habían alcanzado una TER mayor de $350 \Omega\text{cm}^2$. Al alcanzar la polarización se removió el medio de cultivo de los insertos Transwell y se enjuagó de manera delicada con solución salina balanceada de Hank (HBSS) precalentada a 37°C . Después se fijaron las monocapas celulares con glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilato 0.1M a pH 7.2-7.4 durante una hora a temperatura ambiente. Se enjuagó el inserto dos veces con buffer de cacodilato ajustado a 300 mili-osmoles con 6.84% de sacarosa durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se postfijó con tetraóxido de osmio al 1% en buffer de cacodilatos 0.1 M, con 0.1 M de sacarosa a pH 7.2-7.4 durante una hora a 4°C en la oscuridad. Al finalizar la hora, se lavaron las células con buffer de cacodilato con 0.1 M de sacarosa durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después se deshidrató la monocapa celular con incubaciones seriales de 10 minutos con diferentes concentraciones de etanol (35%, 50%, 70%, 95%, 100% y 100% nuevamente). Después se infiltró resina con resina de empotramiento completa (LR white, grado medio o fuerte) dejando en resina al 25% en etanol durante media hora, después se cambió por resina al 50% en etanol y por último con resina al 75% en etanol. Se agregó resina al 100% y se dejó endurecer durante 16 horas. Dos días antes de empezar la fijación de la membrana se añadió resina al 100% a un disco de aluminio agregando hasta llegar a un altura de entre 2 y 3 mm y se dejó polimerizar a 60°C . Se removió la resina del filtro y se colocó sobre la resina polimerizada, se agregó resina fresca para cubrir la membrana y se dejó polimerizar durante 72 horas a 60°C (esto separa la membrana del filtro de

manera espontánea). Se removió el disco de aluminio y el área de resina que contiene a la membrana se separa cortándola. Después se hicieron cortes delgados con un microtomo y se observaron en un microscopio electrónico Zeiss 900 (Unidad de microscopia, IBT).

Determinación del Título Viral: Para calcular el título viral (unidades formadoras de focos (UFF)) se realizó un ensayo de inmunoperoxidasa. Las placas con células MA104 o con IPEC-J2 se infectaron con diluciones seriales de virus, las que se dejaron absorber durante una hora a 37 °C. A las 14 horas postinfección, se fijaron los cultivos infectados con acetona (80%). Posteriormente, se incubaron con anticuerpo policlonal anti-rotavirus (1/2500) (producido en nuestro laboratorio), durante 2 horas, a 37 °C. El anticuerpo se lavó con PBS. La detección del anticuerpo primario se realizó por medio de la proteína A acoplada a peroxidasa (1/3000) (Amersham Pharmacia Biotech). Se utilizó como sustrato una solución que contenía 3-amino-9-etil-carbazole (0.4% p/v). Para contar el número de UFF se utilizó una estación Visiolab 1000 como se reportó previamente (Guerrero *et al.*, 2000).

Infectividad de los Rotavirus en Cultivos Celulares Polarizados: Los cultivos polarizados de IPEC-J2 se infectaron por la cara basolateral o por la cara apical con la misma concentración de unidades formadoras de focos (UFFs) (tituladas en MA104) de YM o Wa y se dejaron incubar durante 1 hora a 37° C. Al finalizar la incubación se lavaron los filtros dos veces por ambas caras del cultivo con medio de cultivo sin FBS, se agregó medio de cultivo y se incubaron durante 14 horas a 37 °C. Por ultimo se realizó una inmunotinción como se describió previamente.

Tratamientos Celulares con Inhibidores de la Endocitosis: Los cultivos polarizados de IPEC-J2 se trataron con una solución 500 µM de sacarosa por la cara apical durante 30 minutos o con una solución 100 µM de Dynasore durante 1 hora previa a la infección con YM. Después, se infectó con 200 FFU/pozo de YM por la cara apical o por la cara basolateral de los cultivos polarizados, manteniendo la misma concentración de sacarosa o Dynasore, según

el caso, y se dejaron incubando durante 1 hora a 37 °C. Al finalizar la incubación se lavaron los filtros 2 veces por ambas caras del cultivo con medio de cultivo sin FBS, se agrego medio de cultivo con la misma concentración del fármaco utilizado en los tratamientos previos, y se incubaron durante 14 horas a 37 °C. Por ultimo, se determino el número de células infectadas como se describió previamente.

Tratamientos Celulares con Inhibidores de la Acidificación Endosomal: Para inhibir la acidificación de los endosomas celulares, los cultivos polarizados de IPEC-J2, se trataron con una solución 10 mM de Cloruro de Amonio (NH₄Cl) o con una solución 100 nM de bafilomicina A1, durante 30 minutos o 1 hora antes de la infección, respectivamente. Después, se infectó con 200 FFU/pozo con la cepa YM por la cara apical o por la cara basolateral de los cultivos polarizados, manteniendo la misma concentración del fármaco (NH₄Cl o bafilomicina A1), y se dejaron incubando durante 1 hora a 37 °C. Al finalizar la incubación se lavaron los filtros 2 veces por ambas caras del cultivo con medio de cultivo sin FBS, se agrego medio de cultivo con la misma concentración del fármaco utilizado en los tratamientos previos, y se incubaron durante 14 horas a 37 °C. Por ultimo, se determinó el número de células infectadas como se describió previamente.

Tratamientos Celulares con Metil-β-Ciclodextrina (MβCD): Para disminuir el colesterol de la membrana plasmática, los cultivos polarizados de IPEC-J2, se trataron con una solución 10 mM de MβCD durante 1 hora previa a la infección. Después, se lavaron las cultivos dos veces con medio de cultivo y se infectaron con 200 FFU/pozo con la cepa YM, por la cara apical o por la cara basolateral, y se dejaron incubando durante 1 hora a 37 °C. Al finalizar la incubación se lavaron los filtros 2 veces por ambas caras del cultivo con medio de cultivo sin FBS y se incubaron durante 14 horas a 37 °C. Por ultimo, se determinó el número de células infecciosas por medio de peroxidasa como se describió previamente.

Tratamientos Celulares con Neuraminidasa: Para estos

experimentos se utilizó la NA de *Arthrobacter ureafaciens* (Sigma-Aldrich). Esta enzima corta específicamente los ácidos siálicos terminales unidos con enlaces $\alpha(2\rightarrow3, 6, 8, 9)$. Los cultivos polarizados de IPEC-J2, se trataron con una solución con 20 o 40 mU/ml de NA, por la cara apical o por la cara basolateral, durante 1 hora previa a la infección. Después, se lavaron los cultivos dos veces con medio de cultivo y se infectaron con 200 FFU/pozo con las cepas YM y Wa, por la cara tratada con NA, y se dejaron incubando durante 1 hora a 37 °C. Al finalizar la incubación se lavaron los filtros 2 veces por ambas caras del cultivo con medio de cultivo sin FBS y se incubaron durante 14 horas a 37 °C. Por último, se realizó un tinción para determinar el número de células infectadas.

Salida del virus post-infección al infectar cultivos polarizados de IPEC-J2: Cultivos polarizados de IPEC-J2 se infectaron con la cepa YM, por la cara apical (con una MOI de 0.1) o por la cara basolateral (con una MOI de 0.1 ó 10), y se dejó adsorber el virus durante 1 hora a 37 °C. Durante este tiempo se tomaron mediciones de la resistencia eléctrica transepitelial (TER) de los cultivos a los 0, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos. Posteriormente, se hicieron 2 lavados con medio de cultivo y se dejaron incubando a 37° C. A las 18, 24, 36, 48, 60 y 72 horas se midió la TER de los cultivos y se recolectó todo el medio de cultivo, tanto de la cara apical como de la basolateral, y se guardó a -20 °C. Después se agregó medio de cultivo nuevo y se incubaron nuevamente los cultivos a 37 °C. Al finalizar las 72 horas, las muestras virales recolectadas se activaron con tripsina y se determinó el título viral en células MA104 y se determinó el título viral como se describió previamente.

Infección de RRV en Células MA104 Tratadas con Dynasore: Las células MA104 tratadas con Dynasore, en 100, 200, 300 y 400 μ M durante una hora previa a la infección. Posteriormente se dejó absorber el virus RRV durante 1 hora a 37 °C manteniendo la misma concentración de Dynasore. Posteriormente se lavó 2 veces con medio fresco, para remover el virus no adsorbido y se agregó medio manteniendo la misma concentración de Dynasore dejando incubar durante 16 horas a 37 °C. Acabando esta incubación las células

se fijaron y se tiñeron, como se describió previamente, para determinar el número de células infectadas las cuales se compararon con un control de células infectadas sin tratamiento.

Internalización de Transferrina-Alexa 488 en Células MA104
Tratadas con Dynasore: Los cultivos celulares de MA104, crecidos en cubreobjetos, se trataron con una solución 100 μ M de dynasore durante 30 minutos a 37 °C. Después se pasaron las células a 4 °C donde se dejaron incubar 5 minutos. A esta temperatura se les agregó a los cultivos una solución de 50 μ g/ml de transferrina acoplada a Alexa 488 manteniendo la misma concentración de dynasore y se dejaron incubando durante 5 minutos. Se lavaron dos veces las células con medio (con dynasore) y se dejaron incubando las células a 37 °C durante una hora manteniendo la misma concentración de dynasore. Después se lavaron dos veces las células con un buffer ácido (glicina 0.1 M, pH 2.5 y con 150 mM de NaCl) para desprender de la membrana plasmática la transferrina no internalizada. Después se fijaron las células con paraformaldehído al 2% durante 20 minutos, se lavaron las células 3 veces con una solución 50mM de NH₄Cl en PBS. Al terminar los lavados, las células se permeabilizaron al incubarlas con una solución de buffer de bloqueo (50 mM NH₄Cl y al 1% de albumina sérica bovina en PBS) con 0.5% de tritón X-100 durante 15 minutos, después se lavaron 3 veces con PBS con 50 mM de NH₄Cl y se bloquearon al incubarlas con buffer de bloqueo durante 6 horas a 4 °C. Luego las células fueron incubadas con DAPI (4'6-Diamidino-2-Fenilindole, Dihidrocloridio) para teñir los núcleos y se observaron en un microscopio de fluorescencia.

RESULTADOS

Puesto que este trabajo es pionero en el uso de la línea celular IPEC-J2 como modelo para estudiar la infección por rotavirus, se realizó una caracterización general del proceso infeccioso en cultivos polarizados de esta línea celular.

Para estudiar la entrada de la cepa YM de rotavirus en cultivos polarizados de la línea celular IPEC-J2, se crecieron las células sobre filtros Transwell cubiertos de colágeno. Estos filtros, con poros de un diámetro de 3 μm , permiten tener acceso tanto a la cara apical como la cara basolateral de los cultivos, para así poder realizar diferentes experimentos e infectar por ambos lados de las células polarizadas de manera independiente. Esta herramienta nos permitió estudiar y caracterizar tanto la entrada del virus por la cara apical como por la cara basolateral de células polarizadas (figura 15).

Después se crecieron las células IPEC-J2 en los filtros Transwell en medio con suero fetal bovino (FBS), cambiando el medio cada segundo día, hasta que llegaron a confluencia. En este momento, a los cultivos se les cambió el medio por un medio sin FBS pero adicionado con Dexametasona. Este glucocorticoide sintético induce la diferenciación de estos cultivos y facilita su polarización (Rasschaert *et al.*, 2010; Koh *et al.*, 2007).

Los Cultivos de Células IPEC-J2 se Polarizan al Crecerlas con Dexametasona en Filtros Transwell

Puesto que un aumento en la resistencia eléctrica transepitelial (TER) de los cultivos es una indicación confiable del grado de polarización de las células, se midió la TER de cada filtro de manera rutinaria después de la adición de la Dexametasona. En la figura 16, se muestran las mediciones de la TER que se

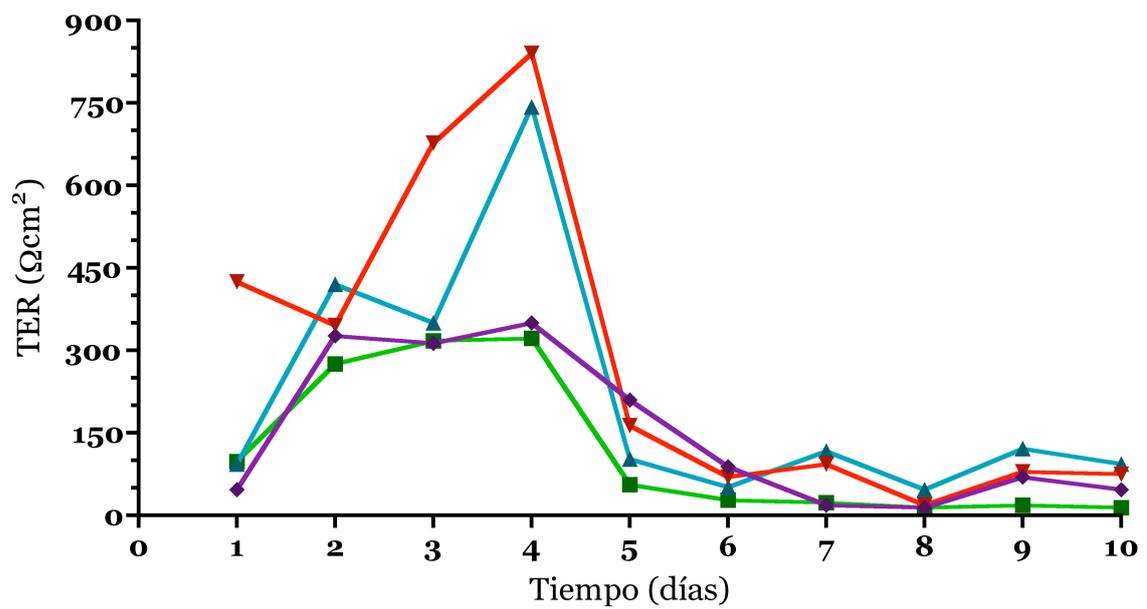


Figura 16. Mediciones de la resistencia eléctrica transepitelial de cultivos de células IPEC-J2. Las células fueron crecidas sobre filtros Transwell cubiertos con colágeno, de 6.5 mm de diámetro y con poros de 3 μm de diámetro, durante 10 días a partir de la adición de dexametasona al medio de cultivo. Cada uno de los colores representa un filtro Transwell con un cultivo celular independiente.

tomaron a 4 diferentes cultivos de IPEC-J2, durante 13 días. Como se puede observar, durante los primeros 4 días hay un aumento de la TER que llega hasta un valor máximo de aproximadamente entre 300-700 Ωcm^2 . La TER, baja súbitamente en los siguientes días de la infección hasta llegar a un nivel basal en el cual se mantiene de manera constante hasta el último día de las mediciones. Las mediciones diarias de la TER durante periodos tan largos, sólo se realizaron durante los primeros cultivos celulares de IPEC-J2 ya que no se había trabajado anteriormente en el laboratorio con esta línea celular. Por lo que esto es sólo es un ejemplo del patrón normal de aumento de la TER de los cultivos IPEC-J2 durante su polarización pero los valores máximos de la TER varían de entre 300-6900 (Brown y Price, 2007; Schierack *et al.*, 2006; Skjolaas *et al.*, 2007; Diesing *et al.*, 2011; Koh *et al.*, 2008). Por este comportamiento, para los experimentos se utilizaron cultivos de células IPEC-J2 pocos días después de la adición de dexametasona y con una TER mayor de 350 Ωcm^2 , aunque la mayoría de los cultivos tenían una TER cercana a 1500 Ωcm^2 cuando se realizaron los experimentos.

Para comprobar el grado de polarización y el estado de las células IPEC-J2, se analizaron, por medio de microscopia electrónica de transmisión, cultivos celulares crecidos en filtros Transwell a los que al llegar a confluencia se les cambio el medio de cultivo a medio adicionado con Dexametasona (sin FBS) y que a los 3 días mostraban una TER mayor a 350 Ωcm^2 . En estas condiciones las células mostraron microvellosidades en la cara apical del cultivo característica típica de células intestinales epiteliales polarizadas (figura 17a). Estas células tienen características físicas comparables con las reportadas para cultivos polarizados de IPEC-J2 (Schierack, *et al.*, 2006). También se observó, que la interacción entre las células es muy estrecha, evidencia del grado avanzado de polarización que tienen estos cultivos (figura 17b). Este contacto tan estrecho entre las células es lo que provoca el valor alto en la TER, característica de los cultivos polarizados de IPEC-J2.

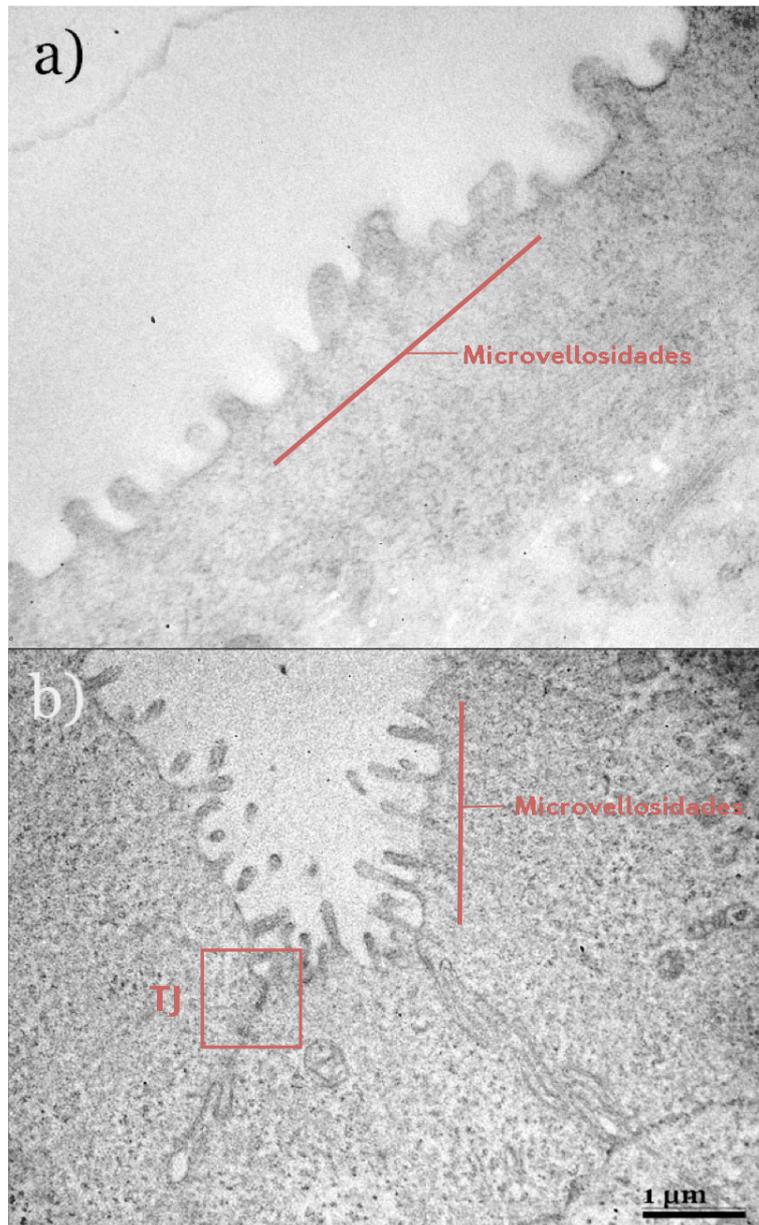


Figura 17. El análisis del grado de polarización de los cultivos de IPEC-J2 por medio de microscopía electrónica de transmisión. **a)** Una imagen de la cara apical de una célula IPEC-J2 polarizada, crecida sobre un filtro Transwell, donde se ven las microvellosidades en toda la superficie celular. **b)** Imagen que muestra la interacción entre tres células IPEC-J2 polarizadas. Aquí también se pueden observar las microvellosidades en la cara apical de las células y las uniones estrechas (TJ) como zonas más electrodensas en la interacción entre células cerca de la cara apical marcadas dentro de un cuadro rojo.

La Cara Basolateral de los Cultivos de IPEC-J2 Polarizados es Más Sensible a la Infección por la cepa YM de Rotavirus que la Cara Apical

El primer paso para explorar las posibles diferencias de la infección de los rotavirus cuando infectan por la cara apical o por la cara basolateral de cultivos polarizados, fue infectar los cultivos polarizados con la cepa YM (cepa sensible a los tratamientos con neuraminidasa) (Mendez *et al.*, 1999) por ambas caras de manera independiente con la misma concentración de partículas virales. Después se determinó el número de focos infecciosos generados en cada caso para ver si había diferencias en la sensibilidad a la infección de los diferentes lados de los cultivos polarizados. Como se puede ver en la figura 18, la infección por la cara basolateral es 10 veces más efectiva que la infección que ocurre por la cara apical si se comparan el número de UFFs entre ambas caras, después de la infección.

Cuando se raspa una monocapa de células MDCKII polarizadas, las células que quedan expuestas a la orilla de la herida de la monocapa, son más susceptibles a la infección por la cepa RRV (Realpe et al., 2010). Para ver si esto ocurrió en nuestro modelo, se rasparon con la punta de una pipeta, cultivos polarizados de IPEC-J2 crecidos en placas para cultivos celular, y se infectaron con la cepa YM. Las células que se encontraron a la orilla de los raspones mostraron ser más propensas a ser infectadas por YM (figura 19) que las demás.

Los Tratamientos Celulares con Neuraminidasa Disminuyen la Infección por Rotavirus de la Cara Apical y Basolateral de Cultivos Polarizados de IPEC-J2

Los ácidos siálicos en la membrana celular sirven como receptores de entrada para la mayoría de las cepas de rotavirus y la sensibilidad a los

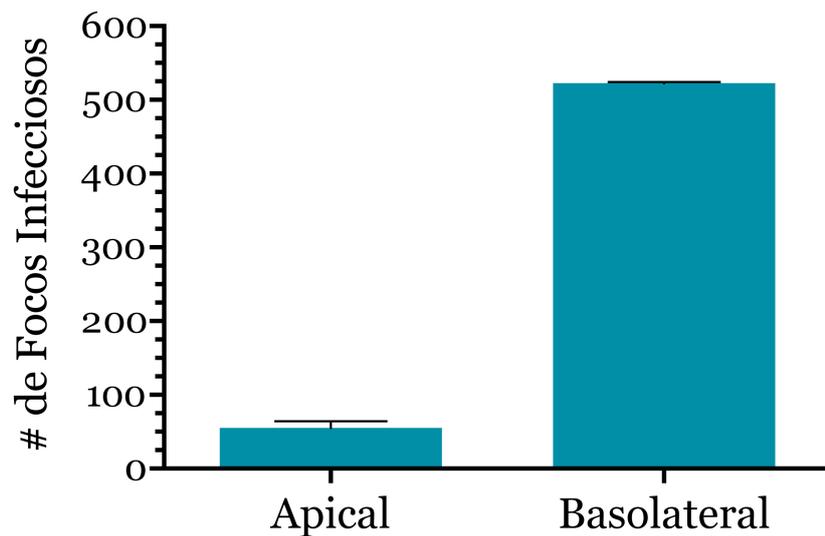


Figura 18. La cepa YM de rotavirus infecta los cultivos polarizados de IPEC-J2 principalmente por la cara basolateral. Los cultivos polarizados de IPEC-J2, crecidos sobre filtros Transwell, fueron infectados con la misma cantidad de partículas infecciosas por la cara apical y por la cara basolateral. En el eje de la Y se grafica el número de focos infecciosos. A la izquierda, en el eje de las X, se muestra los resultados de la infección por la cara apical y a la derecha, se muestran los de la cara basolateral. *Infección apical n=3. Infección basolateral n=3.*

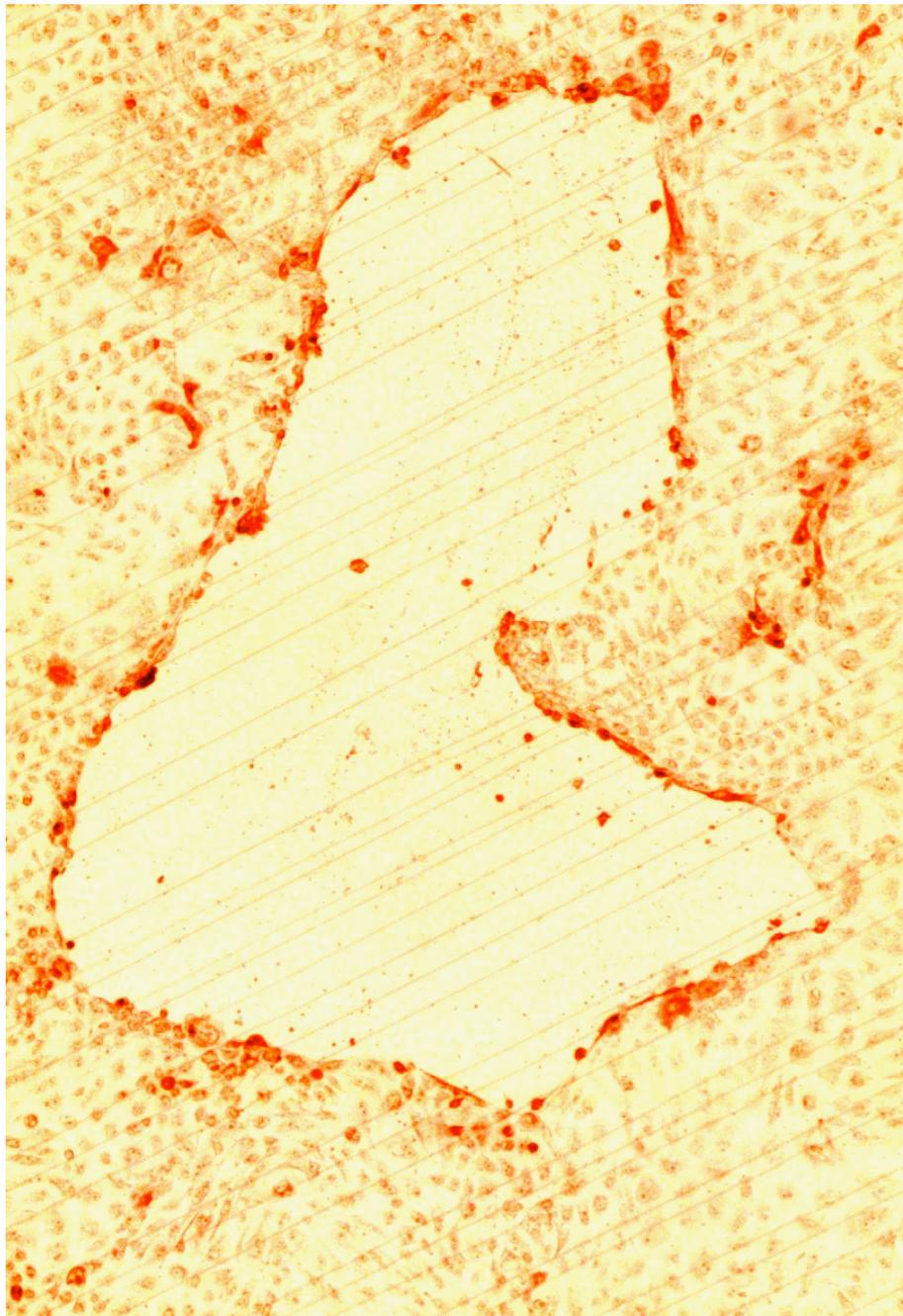


Figura 19. La cepa YM de rotavirus infecta preferentemente las células con la cara basolateral expuesta. Con una punta de pipeta, se raspó una monocapa celular de células IPEC-J2 polarizadas crecidas en una caja de 96 pozos y después se infectó por la cara apical con la cepa YM de rotavirus. Las células teñidas de rojo corresponden a células infectadas por rotavirus.

tratamientos con neuraminidasa (NA) ha sido utilizada como una manera de caracterizar las diferentes cepas de rotavirus. Hay cepas cuya infección disminuye con los tratamientos celulares con NA, como por ejemplo la cepa YM (Mendez *et al.*, 1999). En cambio la infección de otras cepas no se modifica al tratar las células con esta enzima como por ejemplo la cepa de origen humano Wa (Ciarlet y Estes, 1999). Estos experimentos de sensibilidad o resistencia a los tratamientos con NA se han realizado principalmente en la línea celular MA104.

Para saber si la infección de la cepa YM por la cara apical y por la cara basolateral de células polarizadas de origen intestinal era sensible a los tratamientos con NA al infectar células polarizadas de origen intestinal, se trató cada cara con 20 o 40 mU/ml de esta enzima durante una hora previa a la infección.

Los resultados mostraron, que la infección de la cepa YM es sensible a los tratamientos con NA a 20 mU/ml cuando infecta por la cara apical de los cultivos polarizados de IPEC-J2, disminuyendo aproximadamente en un 50%, mientras que su infección por la cara basolateral no disminuye considerablemente a esta concentración de enzima. Cuando se aumentó la concentración de enzima, hasta 40 mU/ml, la infección de YM por la cara apical disminuyó aproximadamente en un 70%, y por la cara basolateral decreció en aproximadamente un 45% (figura 20).

Los Tratamientos Celulares con Sacarosa Previos a la Infección Disminuyen la Entrada de los Rotavirus a los Cultivos Polarizados de IPEC-J2

Para explorar las posibles vías de entrada del virus al infectar células polarizadas, se utilizaron tratamientos químicos con efectos inhibitorios en las diferentes vías endocíticas de la célula.

Lo primero que se probó, fue el efecto de los tratamientos con sacarosa en

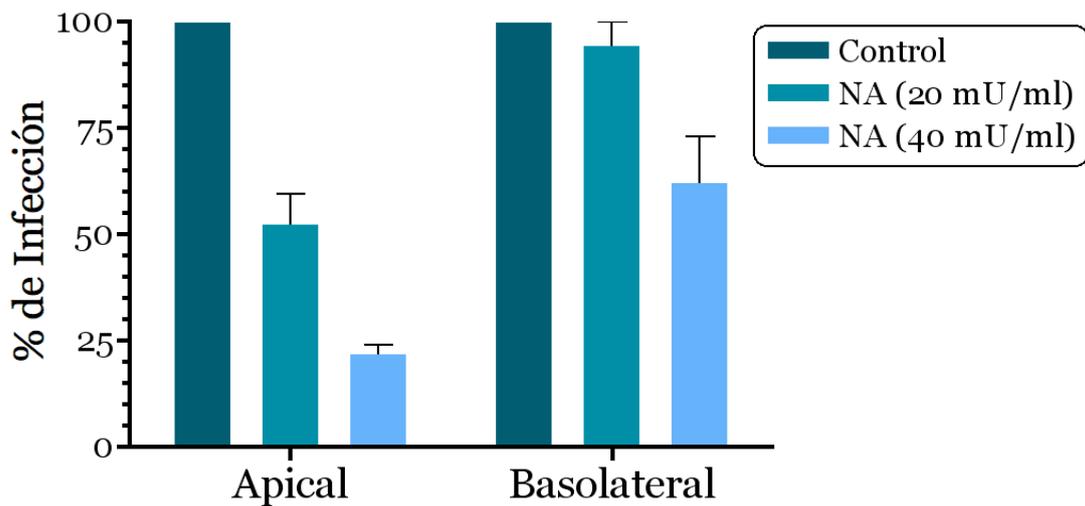


Figura 20. El efecto del tratamiento con neuraminidasa en la infección por rotavirus de células IPEC-J2 polarizadas. Las cultivos de IPEC-J2 polarizados, crecidos sobre filtros Transwell, se trataron con una concentración de 20 mU/ml ó 40 mU/ml de neuraminidasa, por la cara apical o por la cara basolateral, durante una hora. Después se infectaron con a la cepa YM por la cara celular que recibió el tratamiento con NA. El control, es el 100% de infección y representa el número de focos infecciosos al infectar las diferentes caras de los cultivos polarizados sin tratamiento de NA. *Neuraminidasa 20 mU/ml n=3. Neuraminidasa 40 mU/ml n=3.*

la infección de rotavirus. Como se mencionó en la introducción, la sacarosa inhibe la vía endocítica dependiente de clatrina al impedir la formación normal de las cubiertas de clatrina (Hansen *et al.*, 1993). Por lo que se agregó una solución de sacarosa a los cultivos polarizados y posteriormente se infectaron los cultivos por la cara basolateral y por la cara apical, de manera independiente, sin remover la sacarosa durante el tiempo de absorción del virus. Luego, se lavó el remanente de virus y se agregó medio con la misma concentración de sacarosa con la que se dejó incubando para que la infección prosiguiera de manera normal. El tratamiento con sacarosa disminuyó la infección de los rotavirus, por ambas caras de los cultivos, aunque con diferente eficiencia (figura 21): la infección por la cara basolateral disminuyó aproximadamente en un 22% mientras que por la cara apical lo hizo en aproximadamente en un 71%. Después del tratamiento con sacarosa y de la absorción del virus en presencia de sacarosa, se midió la TER de los cultivos, la cual se mantuvo comparable con la TER inicial de los cultivos (resultados no mostrados).

La Concentración de Colesterol de la Membrana Celular es Esencial para la Infección por Rotavirus en Células Polarizadas IPEC-J2

Para analizar la importancia del colesterol en la membrana durante la infección con rotavirus, las células crecidas en filtros Transwell, se trataron con metil- β -ciclodextrina (M β CD). La M β CD es un fármaco que une al colesterol en el centro de su estructura de oligosacárido cíclico. Cuando se incuban las células con una solución de este fármaco se remueve el colesterol de la membrana celular.

Cultivos polarizados de células IPEC-J2 se incubaron durante 30 min con una solución 10 mM de M β CD. Al terminar la incubación, se lavaron los cultivos con medio y se infectaron por la cepa YM tanto por la cara apical como por la basolateral de manera independiente.

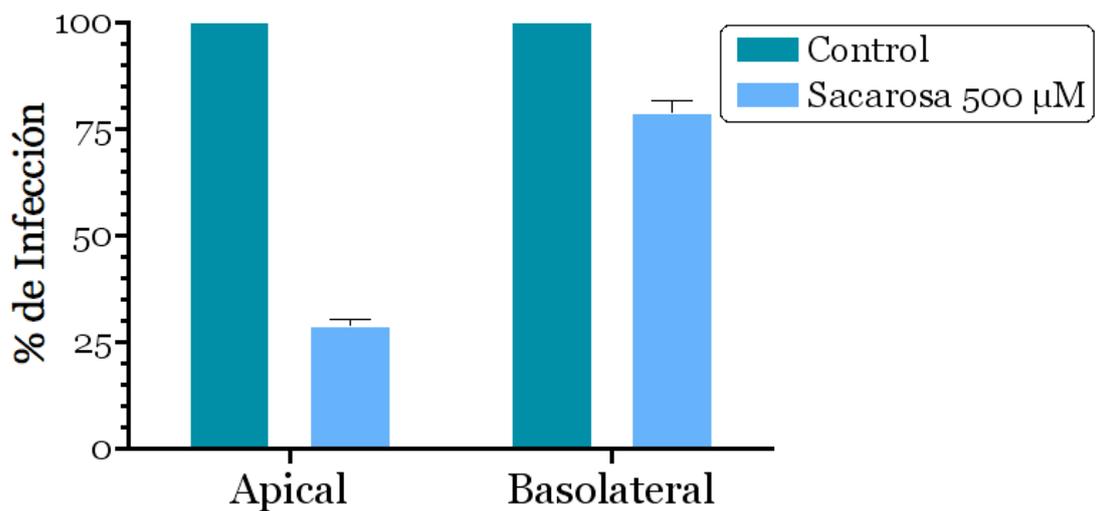


Figura 21. Los tratamientos con sacarosa inhiben la entrada de rotavirus a las células polarizadas. Las cultivos de IPEC-J2 polarizados, cultivados sobre filtros Transwell, se trataron con una concentración de 500 μ M de sacarosa durante media hora antes de ser infectadas por la cepa YM. El tratamiento se mantuvo durante la absorción del virus y durante la incubación. En azul oscuro se muestra la infectividad del virus en células sin tratamiento lo que representa el 100% de infección. En azul claro se comparan el número de focos infecciosos obtenidos durante la infección de las células tratadas con sacarosa y el obtenido en la infección de las células sin tratamiento. *Sacarosa n=3*.

El número de focos infecciosos de las células tratadas con MβCD disminuyó aproximadamente en un 85% (figura 22), tanto en la infección apical como en la infección basolateral, que los que se obtuvieron del control de células infectadas sin tratamiento. La TER de los cultivos después de los tratamientos con este fármaco disminuyó pero se mantuvo en un valor adecuado de cultivos polarizados (resultados no mostrados).

La Infección por los Rotavirus de las Células Polarizadas de IPEC-J2 no Requiere de la Acidificación Endosomal

Existen numerosos ejemplos de virus que requieren del pH ácido endosomal para su internalización al citosol de la célula (Guinea y Carrasco, 1995; Blanchard *et al.*, 2006; Townsley *et al.*, 2006). Para determinar si la cepa YM necesita del pH ácido durante su infección en cultivos polarizados, se trataron las células con una solución 10 mM de NH₄Cl o con una solución 100nM bafilomicina A1. Ambos fármacos se han utilizado en diversos estudios sobre la dependencia de pH endosomal para la entrada viral (Greenberg *et al.*, 2010; Guinea y Carrasco, 1995; Blanchard *et al.*, 2006; Townsley *et al.*, 2006). Los cultivos polarizados de IPEC-J2 se incubaron con estos fármacos de manera independiente durante una hora, posteriormente se infectó con la cepa YM de rotavirus, por ambas caras del cultivo, manteniendo a los fármacos y se dejó adsorber durante una hora. Por último, se dejó proceder la infección incubando las células con los fármacos durante 16 horas a 37 °C ya que el efecto de estos fármacos es reversible.

Como se puede ver en la figura 23a, los tratamientos con NH₄Cl no tuvieron un efecto en la infección de esta cepa por ninguna de las dos caras. Por otro lado, los tratamientos con bafilomicina A1 disminuyeron en aproximadamente un 50% la infección por la cara basolateral de los cultivos pero la infección por la cara apical no se vio afectada (figura 23b).

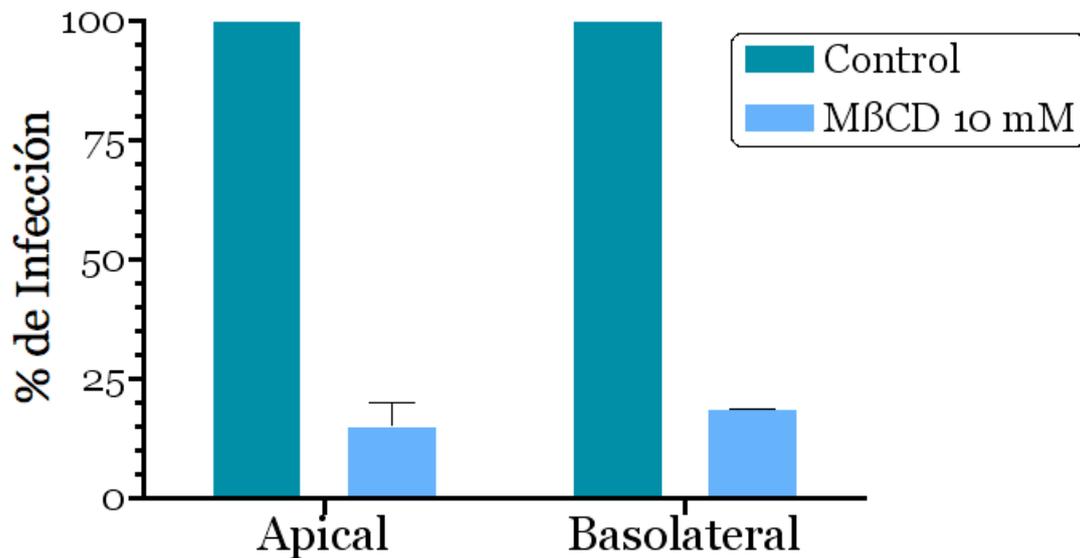


Figura 22. La concentración del colesterol en la membrana celular tiene un papel clave en la entrada del virus a las células polarizadas. Los cultivos polarizados de IPEC-J2, crecidos sobre filtros Transwell, se trataron con una concentración de 10 mM de MβCD durante media hora previa a ser infectadas con la cepa YM de rotavirus. En azul oscuro se muestra el número de focos infecciosos obtenidos al infectar los cultivos polarizados sin tratamiento (representando el 100 % de infección). En azul claro se comparan el número de focos infecciosos obtenidos al infectar cultivos tratados con MβCD y el número de focos infecciosos del control. *MβCD n=3.*

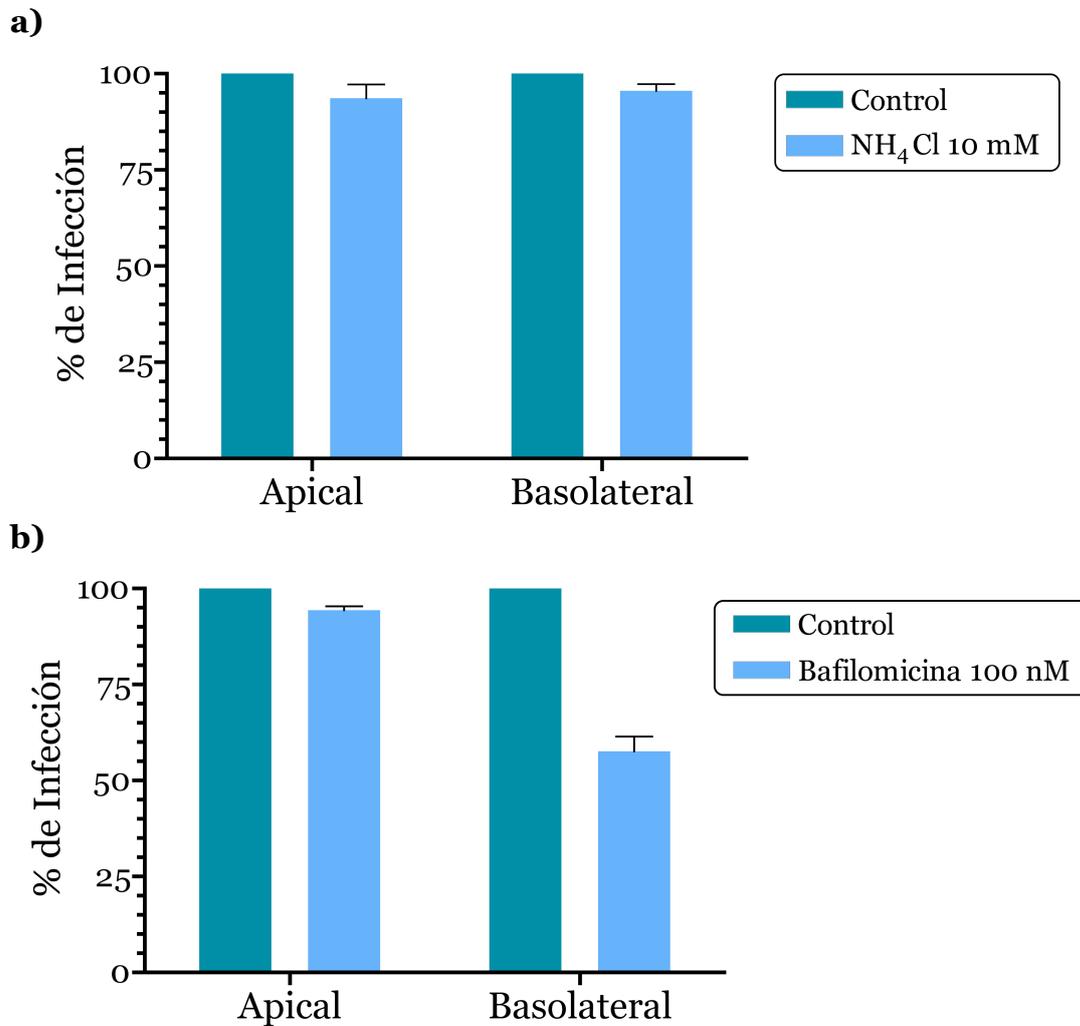


Figura 23. La infección de las células polarizadas IPEC-J2 por la cepa YM no requiere de la acidificación endosomal. **a)** Las cultivos polarizados de IPEC-J2, crecidos sobre filtros Transwell, se trataron con una concentración de 10 mM de NH₄Cl o **b)** con 100 nM de bafilomicina A1 antes de infectarse con YM. Se mantuvo el mismo tratamiento durante la absorción del virus y durante la incubación de 16 horas. En azul oscuro se muestra el número de focos infecciosos obtenidos al infectar los cultivos celulares sin tratamiento farmacológico (representando el 100 % de infección). En azul claro se comparan el número de focos infecciosos obtenidos al infectar los cultivos tratados con NH₄Cl o con bafilomicina A1 y el número de focos infecciosos del control. NH₄Cl n= 3. Bafilomicina A1 n=5.

La Inhibición de la Dinamina por Dynasore no **Afecta la Infección por Rotavirus en Cultivos** **Polarizados de IPEC-J2**

Como se mencionó en la introducción, el funcionamiento de varias de las vías endocíticas celulares dependen de la GTPasa dinamina, por lo que una manera fácil de conocer si las vías que pudiera utilizar el virus durante su entrada a los cultivos polarizados de IPEC-J2 utilizan o no esta GTPasa, es infectar cultivos tratados con el Dynasore. Dynasore es un inhibidor específico del dominio de GTPasa de las 3 isoformas de dinamina.

Los cultivos se trataron con 100 μM de Dynasore durante media hora, posteriormente se infectaron los cultivos con YM por ambos lados y se dejó absorber el virus durante una hora en presencia del fármaco. Por último, se incubaron los cultivos infectados a 37 °C durante 16 horas en presencia del fármaco ya que el efecto del fármaco es reversible si este se remueve.

Como se aprecia en la figura 24 el número de focos infecciosos en cultivos tratados con este fármaco no se modificó si se comparan con el número de focos infecciosos de cultivos control sin tratamiento. Este resultado fue el mismo sin importar si los cultivos se infectaron por la cara apical o por la cara basolateral.

Ya que la entrada de RRV en células MA104 (el modelo principal en el estudio de la entrada de rotavirus) está reportado como un proceso dependiente a dinamina, se realizó el mismo experimento utilizando ahora este modelo experimental. Los cultivos de MA104 se trataron durante media hora previa a la infección con 50, 100, 200 ó 400 μM de Dynasore y después se infectó con RRV dejando absorber el virus durante una hora manteniendo la misma concentración de Dynasore. Al terminar la hora de absorción se hicieron dos lavados con medio de cultivo y se dejaron incubando durante 16 h a 37 °C manteniendo la misma concentración de fármaco. La infección de RRV no disminuyó con las concentraciones de 50, 100 y 200 μM de Dynasore. A la concentración de 400 μM de Dynasore la infección disminuyó en aproximadamente un 40% (figura 25).

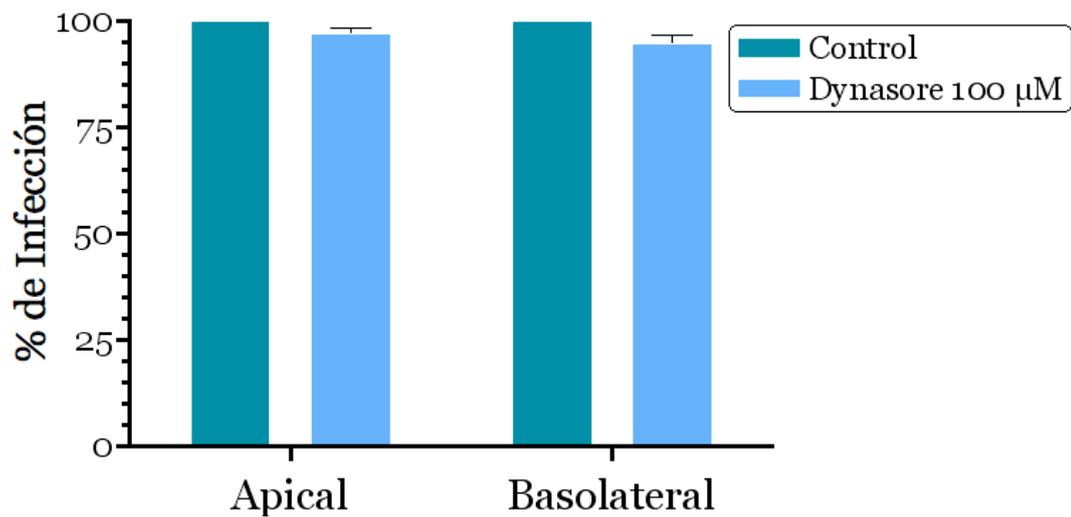


Figura 24. La inhibición de la GTPasa dinamina no afecta la infección de YM en células polarizadas. Los cultivos polarizados de IPEC-J2 crecidos, sobre filtros Transwell, se trataron durante 1 hora, previa a la infección, con una solución 100 μ M de Dynasore. Se mantuvo el mismo tratamiento durante la hora de absorción del virus y durante la incubación posterior de 16 horas. En azul oscuro se muestra el número de focos infecciosos obtenidos al infectar los cultivos celulares sin tratamiento farmacológico (representando el 100 % de infección). En azul claro se comparan el número de focos infecciosos obtenidos al infectar los cultivos tratados con Dynasore y el número de focos infecciosos del control. *Dynasore* $n=4$.

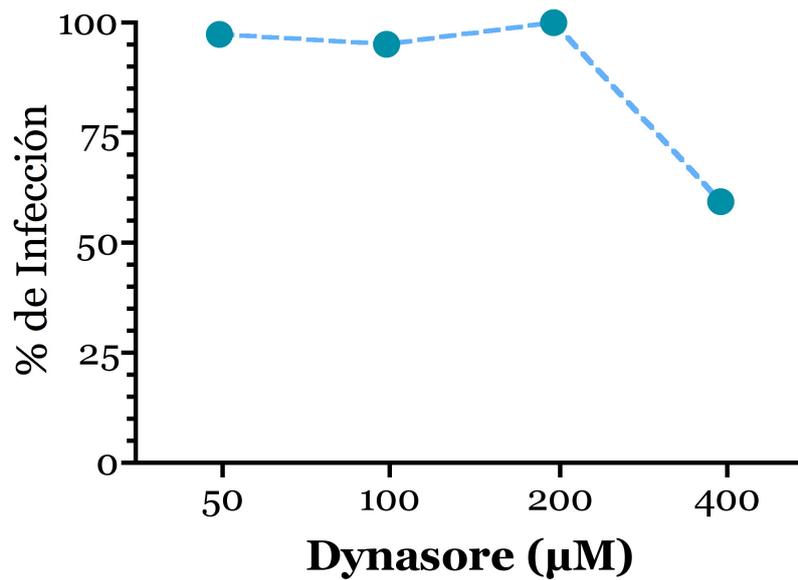


Figura 25. La inhibición de la GTPasa dinamina por Dynasore no afecta la infección por RRV en células MA104. Los cultivos de MA104 se trataron durante una hora con distintas concentraciones de Dynasore y después se infectaron con RRV. Luego se determinó el número de células infectadas en todas las concentraciones y se compararon con un control sin tratamiento.

Para corroborar que el Dynasore utilizado en estos experimentos estuviera activo y estuviera cumpliendo con su actividad inhibidora, se probó su efecto en la internalización de la proteína transferrina acoplada a Alexa 488 en células MA104. La transferrina se internaliza por la vía endocítica dependiente de clatrina y se ha utilizado extensamente como marcador de la actividad de esta vía. Esta vía endocítica es dependiente de la actividad de dinamina por lo que los tratamientos con Dynasore debieran bloquear la internalización de la transferrina. Como se observa en la figura 26, se bloqueó la endocitosis de la transferrina en células MA104 tratadas con este inhibidor, al contrario del control sin tratamiento.

La Salida de la Progenie Viral de Rotavirus al Infectar Cultivos Polarizados es Principalmente por la Cara Apical

Durante una infección con rotavirus se producen miles de partículas virales las cuales se liberan de la célula al medio extracelular. Para determinar si existe una preferencia en la liberación de partículas virales por alguna de las dos caras de los cultivos polarizados, se infectaron filtros con IPEC-J2 polarizadas por la cara apical o por la cara basolateral a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 y de 10. A diferentes tiempos post-infección se recolectó en su totalidad el medio celular apical y basolateral de los cultivos y se reemplazó con medio celular nuevo. Durante la absorción del virus y durante todas las recolecciones virales se midió la TER de los cultivos para comprobar el grado de polarización y el estado de la monocapa. Como el volumen del medio de cultivo de la cara apical es menor que el de la cara basolateral, se calculó el número total de UFF que se liberaron en ambos casos para poder así comparar ambos casos de manera directa.

Al infectar con una MOI de 0.1 por la cara basolateral o la cara apical, la TER durante las primeras 36 horas post-infección se mantuvo relativamente constante pero a partir de las 48 horas post-infección la TER disminuyó

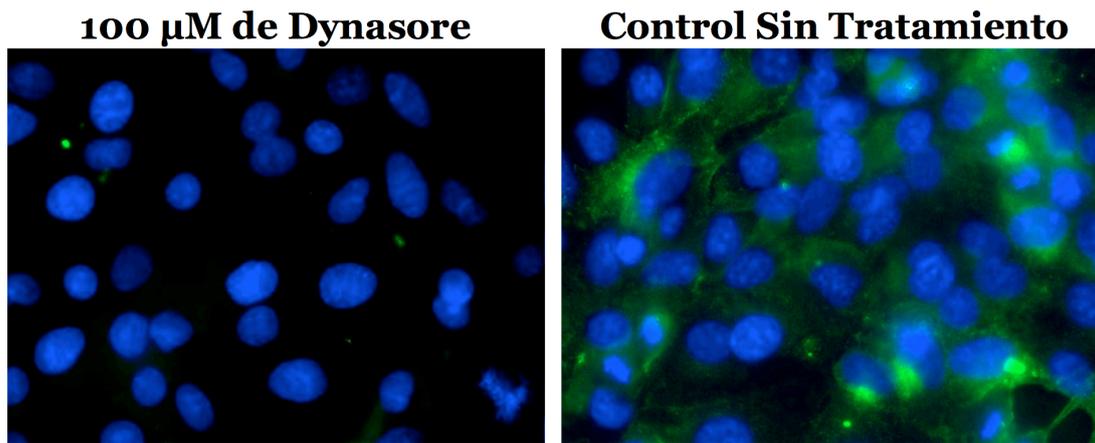


Figura 26. El Dynasore inhibe la endocitosis de la transferrina al interior de la célula. Se trataron las células MA104 con 100 μ M de Dynasore y se observó la internalización a la célula de la transferrina marcada fluorescentemente. En la foto de la izquierda se muestran las células tratadas con Dynasore y en la foto de la derecha se muestran las células del control sin tratamiento. Los núcleos celulares están marcados de azul y la transferrina está marcada de verde.

gradualmente llegando a su valor mas bajo a las 72 horas post-infección (figura 27a y figura 28a). El valor de la TER medida durante los experimentos nos indica que los cultivos se encontraban polarizados hasta las 36 horas y que la monocapa se encontraba completa. Los resultados mostraron que sin importar la cara por la que se infecten los cultivos polarizados, la liberación viral es mayor por la cara apical que por la cara basolateral. Esta tendencia comienza desde las 18 horas y se mantiene durante todas las mediciones subsecuentes (figura 27a y figura 28a). El mayor número de partículas infecciosas se libera durante las primeras 36 horas post-infección y disminuye considerablemente a las 48 y 72 horas post-infección (figura 27a y figura 28a). El número total de partículas virales infecciosas liberadas por la cara apical durante la infección por rotavirus, ya sea al infectar por la cara apical o por la cara basolateral, es aproximadamente 12 veces mayor que el número total de partículas infecciosas liberadas por la cara basolateral (figura 27b y figura 28b).

Posteriormente, se realizó el mismo experimento pero los cultivos se infectaron con una MOI de 10 solamente por la cara basolateral. Este experimento mostró, que la salida viral se da principalmente por la cara apical de los cultivos polarizados (figura 29a y b). En este caso la producción y salida viral se mantuvo a un nivel similar durante las 72 horas del muestreo. En este caso la TER de los cultivos se mantuvo elevada durante la hora de absorción viral pero bajo hasta un nivel basal a las 18 horas post-infección y las células al observarse por el microscopio mostraron un efecto citopático evidente. Al infectar con una MOI de 10 se liberaron aproximadamente 8 veces mas partículas virales infecciosas por la cara apical que cuando se infecto con una MOI de 0.1.

La Cara Basolateral de los Cultivos de IPEC-J2 Polarizados es Más Sensible a la Infección por la cepa Wa y su Infectividad es Resistente a NA

La infección de la cepa Wa es resistente a los tratamientos con NA por lo

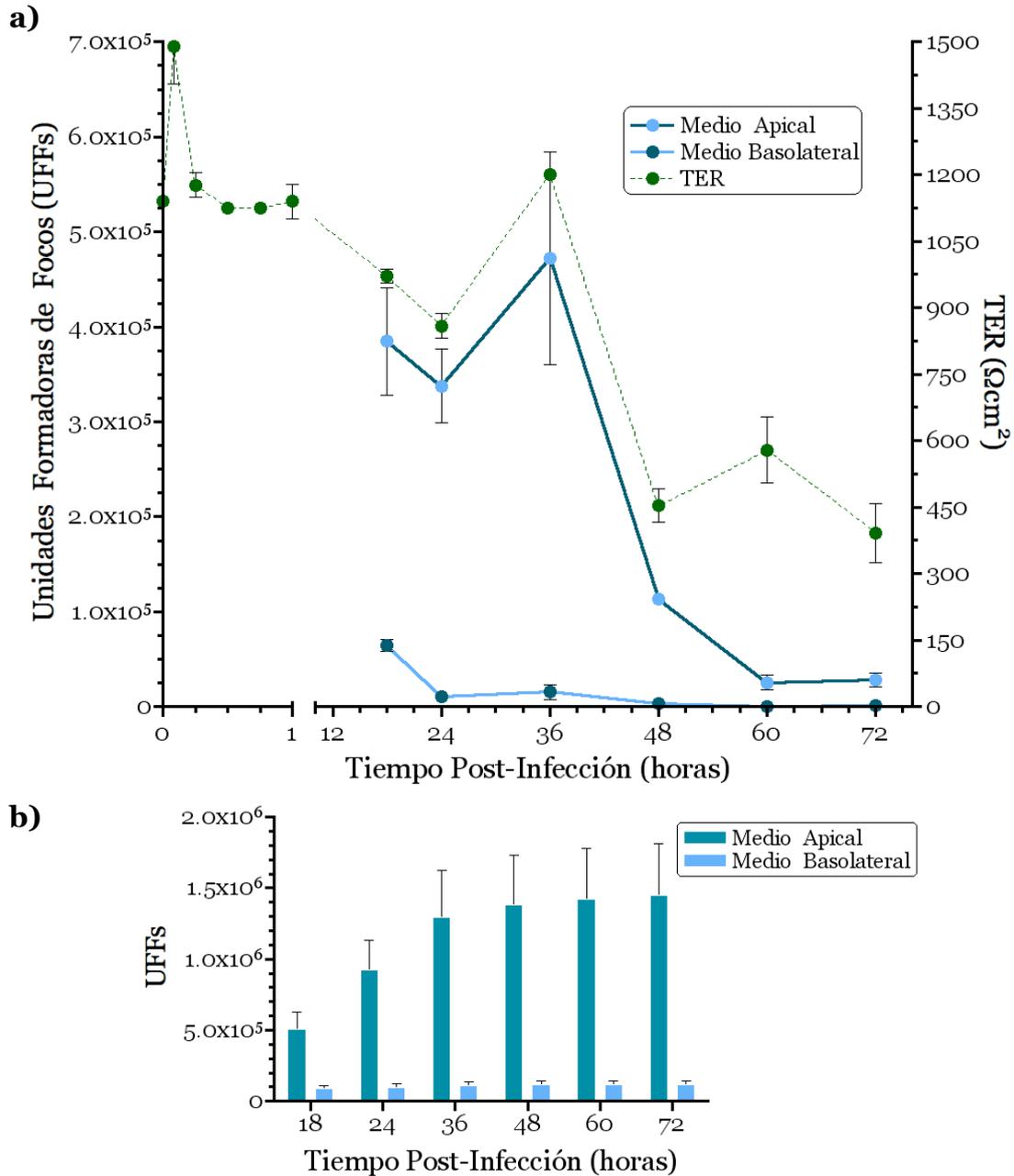


Figura 27. La progenie viral sale principalmente por la cara apical de los cultivos polarizados de IPEC-J2 infectados por la cara apical con la cepa YM a una MOI de 0.1. a) Las células IPEC-J2 polarizadas, cultivadas sobre filtros Transwell, se infectaron por la cara apical con la cepa YM a una MOI de 0.1. Se recolectó el medio apical y basolateral, de cultivos polarizados, a las 18, 24, 36, 48, 60 y 72 horas post infección y se determinó el título viral. Tomando en cuenta el volumen total del medio en las diferentes caras celulares, se calculó el número total de partículas virales infecciosas obtenidas en ambos casos. Se midió la TER de los cultivos a los 5, 15, 30, 45 y 60 minutos de la absorción y antes de cada una de las recolecciones de medio. En azul oscuro se graficó el número de partículas infecciosas de las muestras del medio apical, de azul claro las muestras del medio basolateral (eje de la Y izquierdo) y de verde la TER (eje de la Y derecho). **b)** La gráfica muestra la sumatoria total de partículas infecciosas obtenidas hasta las 72 horas post-infección. Las barras azul oscuro representan el número de partículas infecciosas totales obtenidas en el medio apical y en azul claro las del medio basolateral. *Salida apical n=3. Salida basolateral n=3.*

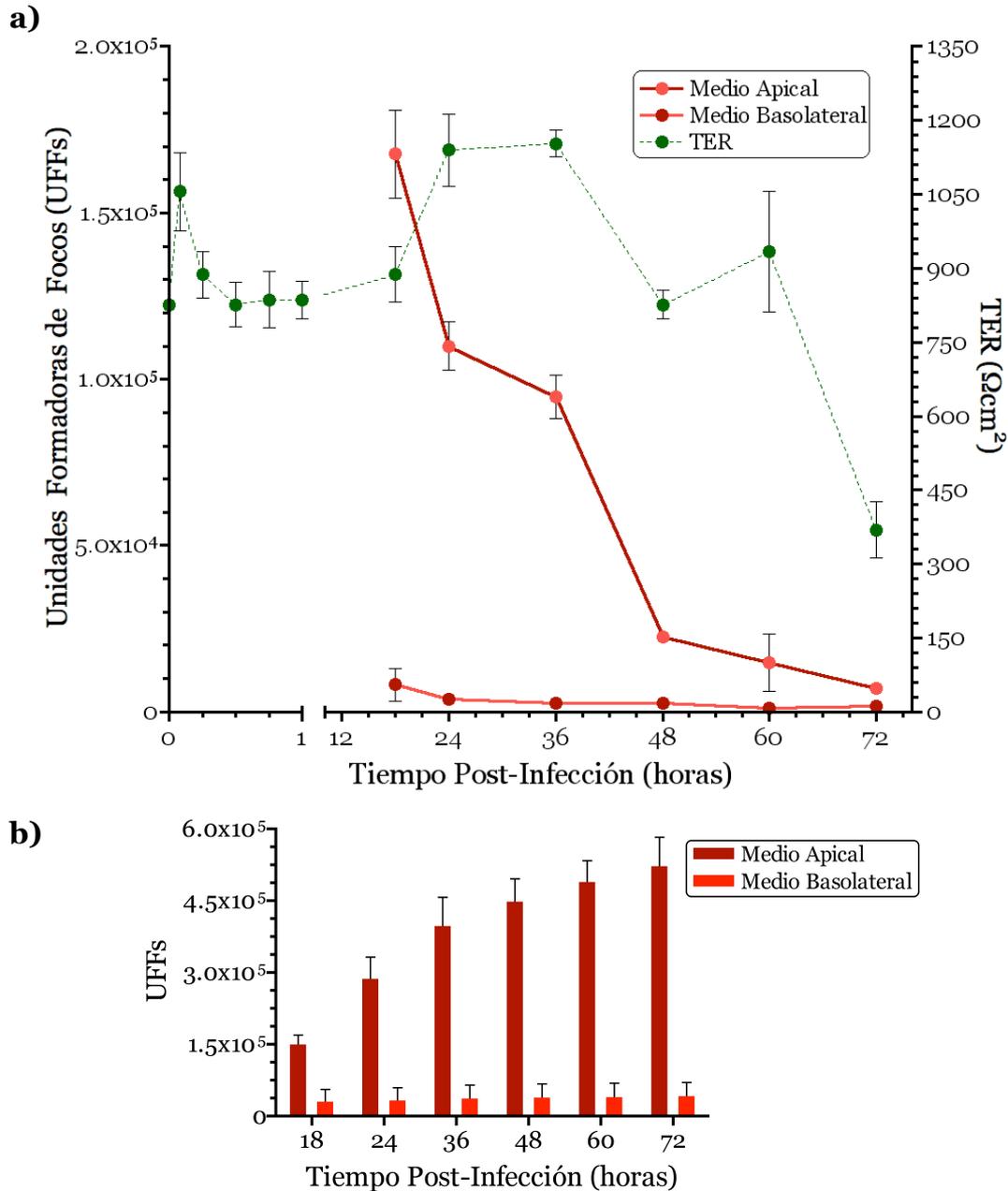


Figura 28. La progenie viral sale principalmente por la cara apical de los cultivos polarizados de IPEC-J2 infectados con la cepa YM por la cara basolateral a una MOI de 0.1. **a)** Las células IPEC-J2 polarizadas, crecidas sobre filtros Transwell, se infectaron por la cara basolateral con la cepa YM a una MOI de 0.1. Se recolectó el medio apical y basolateral, de cultivos polarizados, a las 18, 24, 36, 48, 60 y 72 horas post infección y se determinó el título viral. Tomando en cuenta el volumen total del medio en las diferentes caras celulares, se calculó el número total de partículas virales infecciosas obtenidas en ambos casos. Se midió la TER a los 5, 15, 30, 45 y 60 minutos de la absorción y antes de cada una de las recolecciones de medio. En rojo oscuro se grafica el número de partículas infecciosas de las muestras tomadas del medio apical, de rojo claro las muestras del medio basolateral (eje de la Y izquierdo) y de verde la TER (eje de la Y derecho). **b)** La gráfica muestra la sumatoria total de las partículas infecciosas obtenidas hasta las 72 horas post-infección. Las barras rojo oscuro representan el número de partículas infecciosas totales obtenidas en el medio apical y en rojo claro las del medio basolateral. Salida apical $n=3$. Salida basolateral $n=3$.

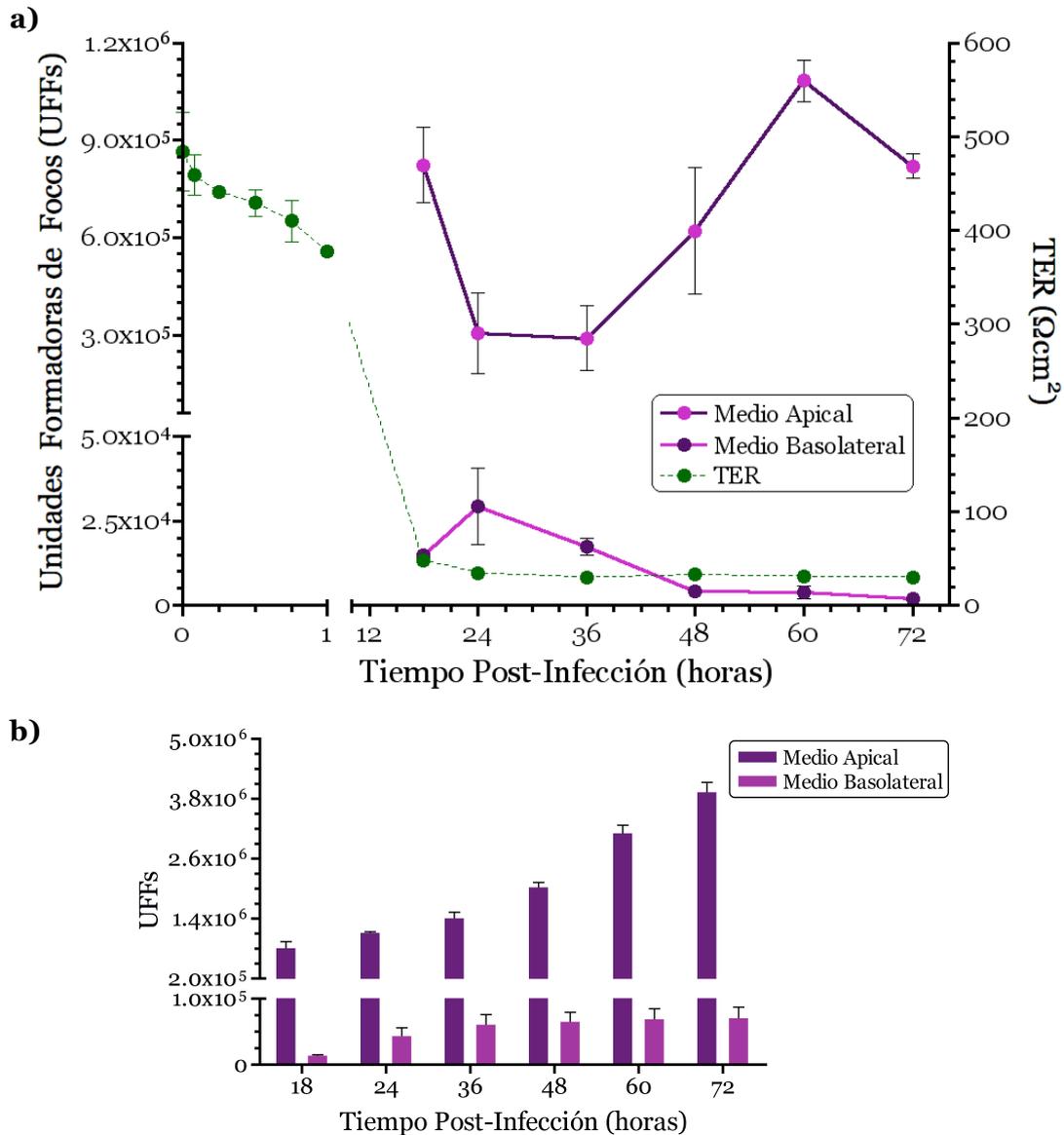


Figura 29. La progenie viral sale principalmente por la cara apical de los cultivos polarizados de IPEC-J2 infectados por la cara basolateral con la cepa YM a una MOI de 10. **a)** Las células IPEC-J2 polarizadas, crecidas sobre filtros Transwell, y se infectaron por la cara basolateral con la cepa YM a una MOI de 10. Se recolectó el medio apical y basolateral, de cultivos polarizados, a las 18, 24, 36, 48, 60 y 72 horas post infección y se determinó el título viral. Tomando en cuenta el volumen total del medio en las diferentes caras celulares, se calculó el número total de partículas virales infecciosas obtenidas en ambos casos. Se midió la TER de los cultivos a los 5, 15, 30, 45 y 60 minutos de la absorción y antes de las recolecciones de medio. En morado oscuro se grafica el número de partículas infecciosas obtenidas del medio apical, de morado claro las muestras las del medio basolateral (eje de la Y izquierdo) y de verde la TER (eje de la Y derecho). **b)** La gráfica muestra la sumatoria total de las partículas infecciosas obtenidas hasta las 72 horas post-infección. Las barras de color morado oscuro representan el número de partículas infecciosas totales obtenidas en el medio apical y en morado claro las del medio basolateral. Salida apical $n=3$. Salida basolateral $n=3$.

que es interesante comparar su infección en cultivos polarizados de IPEC-J2 con los resultados de la cepa YM (infección sensible a NA) y observar si esta característica influye en las diferencias en la susceptibilidad a la infección entre las dos caras celulares. Como se observa en la figura 30a, de igual manera que la infección YM, esta cepa es más eficiente cuando infecta la cara basolateral de los cultivos polarizados. La infección por la cara basolateral es aproximadamente 10 veces más efectiva que cuando la infección ocurre por la cara apical de los cultivos.

Para estudiar y comparar el efecto que los tratamientos con NA tenían en la infección de una cepa resistente a NA, se realizó un experimento utilizando una concentración única de 40 mU/ml de NA y se infectó con la cepa Wa. Al contrario de la infección con YM, la infección por la cepa Wa no se modificó sin importar por cual de las caras se infectara (figura 30b) tal como se ha observado cuando esta cepa infecta cultivos de MA104.

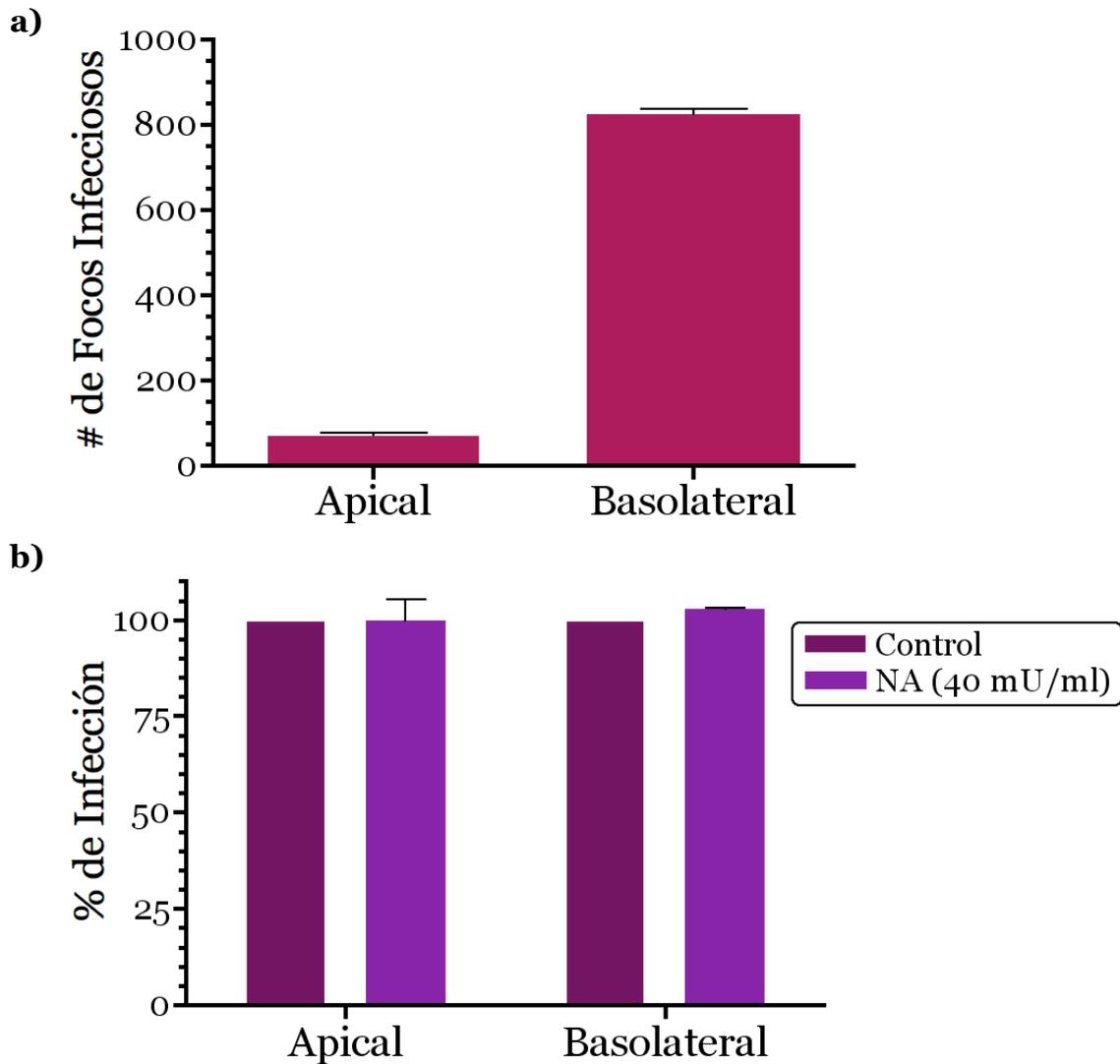


Figura 30. La cepa de rotavirus de origen humano, Wa, infecta los cultivos polarizados de IPEC-J2 principalmente por la cara basolateral y su infección es resistente a los tratamientos con NA **a)** Los cultivos polarizados de IPEC-J2, crecidos sobre filtros Transwell, se infectaron con la cepa Wa de rotavirus. Se determinó el número de células infectadas (con la misma concentración de virus) al agregar el virus por la cara apical (la barra de la izquierda) o por la cara basolateral de los cultivos polarizados (la barra de la derecha). **b)** Las células se trataron con una concentración de 40 mU/ml de neuraminidasa durante una hora antes de ser infectadas con la cepa Wa. El control, es el 100% de infección y representa el número de focos infecciosos al infectar las diferentes caras de los cultivos polarizados sin tratamiento de NA. *Neuraminidasa n=3.*

DISCUSIÓN

En ausencia de un mejor modelo de investigación, la infección por rotavirus se ha estudiado principalmente en la línea celular de riñón de mono verde MA104. Esta línea celular se ha utilizado especialmente por ser altamente permisiva a la infección. Sin embargo, in vivo, los rotavirus infectan a los enterocitos maduros del intestino delgado. Se han reportado varios ejemplos de las diferencias que surgen al estudiar la infección en diferentes tipos. Para evitar resultados heterogéneos conviene utilizar modelos lo más cercanos posibles al evento natural. La línea celular IPEC-J2, se obtuvo de intestino delgado de puerco y tiene características fisiológicas y bioquímicas cercanas a las de los enterocitos maduros intestinales de un animal completo. Por lo tanto, esta línea celular es un buen modelo para estudiar la infección por los rotavirus, y específicamente la entrada del virus a la célula, que es en lo que se centra este trabajo.

Nuestro primer objetivo en este trabajo fue establecer el protocolo de polarización de los cultivos de IPEC-J2 crecidos en filtros Transwell. Este tamaño de poro es el óptimo para estudiar la infección de rotavirus ya que permite el paso del mayor número de partículas virales sin dejar pasar células IPEC-J2 impidiendo así que se forme una monocapa celular en la parte inferior del filtro. Una vez establecido el protocolo de polarización, se infectaron ambas caras de la monocapa celular con las cepas de rotavirus YM (NA sensible) y Wa (NA resistente). En este primer experimento se observó que la cara basolateral es aproximadamente 10 veces más sensible que la cara apical a la infección de ambas cepas virales. Si tomamos en cuenta que tan sólo entre un cuarto y un sexto de los virus son capaces de atravesar estos filtros (poros de 3.0 μm) para infectar a las células de manera exitosa (Realpe *et al.*, 2010), entonces la cara basolateral de las células polarizadas IPEC-J2 es entre 30 y 60 veces más sensible a la infección por rotavirus que la cara apical. Ya que este comportamiento es similar tanto para la cepa YM como para la cepa Wa, la susceptibilidad a los

tratamientos con NA no es una variable relevante para explicar estos resultados. Como se mencionó en la introducción, aunque hay pocos trabajos en la literatura que estudien la infección de rotavirus en células polarizadas, existe una gran discrepancia entre los diferentes resultados. Se ha discutido que estas diferencias pudieran deberse al uso de filtros Transwell con diferentes tamaños de poro (Ciarlet et al., 2001; Realpe, et al. 2010). Aunque estas discordancias también pudieran deberse a que varios de estos estudios se realizaron en diferentes líneas celulares (Ciarlet et al., 2001).

Una de las diferencias de este trabajo con los anteriores, es que la proporción de la infección entre la cara basolateral y la cara apical de los cultivos polarizados de IPEC-J2 es mucho mayor que la de otras líneas celulares estudiadas como la Caco2 y la MDCK (Ciarlet et al., 2001; Realpe, et al. 2010). En la línea celular IPEC-J2, la cara basolateral se infecta en una proporción de entre 30 y 60 veces más que la cara apical, mientras que cuando infecta la cepa Wa cultivos polarizados de MDCKII, la proporción es de tan solo 11 veces (Realpe *et al.*, 2010). Estas diferencias pueden tener varias explicaciones: 1) al ser IPEC-J2 una línea celular de enterocitos con características fisiológicas y bioquímicas cercanas a las células hospederas de una infección *in vivo* (Gonzalez-Vallina et al., 1996; Schierack, P. et al., 2006; Mariani, V. et al., 2009), es posible que esta línea contenga todos los receptores que utiliza rotavirus durante una infección en el animal completo, y que éstos se encuentren distribuidos de una manera óptima. En cambio otras líneas celulares, más alejadas del modelo natural, pueden no tener todos los receptores celulares o éstos pudieran encontrarse distribuidos de una manera distinta, haciendo las diferencias entre la infección por la cara basolateral y la apical menos drásticas. 2) Otra posible explicación es que la vía endocítica utilizada por el virus durante su entrada esté más activa en la cara basolateral que en la cara apical, haciendo más eficiente su entrada. Existen diferencias en la presencia y en la actividad de las diferentes vías endocíticas en las dos caras de los cultivos polarizados. Por ejemplo, la vía endocítica dependiente de caveolina sucede exclusivamente por la cara basolateral de células polarizadas (Verkade *et al.*, 2000; Vogel *et al.*, 1998) y que

una fracción mayor de la endocitosis independiente de clatrina ocurre por esta misma cara (Sandvig y van Deurs, 2005). Esta propuesta supondría que el virus entra directamente a la célula por la cara por la que se infecta (no sufre transcitosis), que la fuerza total de interacción con sus receptores celulares es equivalente en ambas caras y que la única variante entre ambos escenarios sea la actividad y la eficiencia endocítica celular de cada cara celular. 3) La última explicación, para las cepas diferentes a Wa, es que al ser distintas las cepas de rotavirus utilizadas en los demás trabajos, estas pudieran tener diferentes características (cualquiera que estas sean) a las de YM y Wa que las hicieran infectar con una proporción menor la cara apical y la cara basolateral.

Aún se desconoce cual es el mecanismo de entrada de los rotavirus durante una infección *in vivo*, sin embargo, sí se ha caracterizado este fenómeno en cultivos celulares: la primera interacción de los rotavirus con la célula probablemente sea con los ácidos siálicos ya que son abundantes en la membrana apical. Se sabe que los gangliósidos GM1 y GD3 (glucoesfingolípidos sializados implicados en la entrada de rotavirus) se localizan en la cara apical de cultivos polarizados de células epiteliales (Crespo *et al.*, 2008) y que probablemente otros tipos de gangliósidos también se encuentren en esta cara celular. Después de este paso, los rotavirus interaccionan con diferentes integrinas (Isa, *et al.*, 2008) las cuales se localizan exclusivamente en la cara basolateral de las células epiteliales polarizadas (Schoenenberger, *et al.*, 1994). Esto, pudiera ser la principal razón por lo cual la cara basolateral es más sensible a la infección por rotavirus ya que los rotavirus que infectan por esta cara tendrían inmediatamente disponibles este tipo de receptores virales, lo que pudiera hacer al proceso infeccioso más eficiente. En contraste, cuando los rotavirus infectan por la cara apical, estos receptores se encuentran inicialmente protegidos por debajo de las uniones estrechas, limitándose así la infección viral. Se sabe que VP8 (el producto proteolítico de la proteína estructural viral VP4) es capaz de debilitar las uniones estrechas de la células lo que permite que al menos algunas integrinas que funcionan como receptores post-uni6n, pasen a la membrana apical de la célula donde pudieran interaccionar con los rotavirus y, de este modo, potenciar el

proceso de entrada (Nava *et al.*, 2004). También se sabe, que durante una infección por rotavirus la proteína no estructural del virus NSP4 se excreta por la cara apical de la células infectadas (Bugarcic *et al.*, 2006) y que por sí sola es capaz de debilitar las uniones estrechas y provocar un goteo paracelular (Tafazoli *et al.*, 2001). En el contexto de una infección *in vivo*, la apertura de las uniones estrechas, mediada por VP8 y/o NSP4, pudiera favorecer el movimiento de los receptores virales de la cara basolateral a la cara apical fomentando así el desarrollo de la infección. Cuando los rotavirus infectan directamente la cara basolateral de los cultivos polarizados de IPEC-J2 crecidos en filtros, estos receptores (post-unión) se encuentran inmediatamente disponibles para que el virus interactúe con ellos y continúe la entrada, haciendo el proceso mucho más eficiente por esta cara.

Existen varios ejemplos en los que se correlaciona la mayor sensibilidad a la infección de alguna de las caras de cultivos polarizados con la localización de los receptores virales. Los reovirus, miembros de la misma familia viral que los rotavirus, infectan preferencialmente por la cara basolateral de los cultivos primarios polarizados de células epiteliales humanas de las vías aéreas y su principal receptor viral es la proteína JAM-A (Excoffon *et al.*, 2008). Esta proteína se encuentra principalmente en las uniones estrechas, en menor proporción en la cara basolateral y completamente ausente de la cara apical de estos cultivos celulares (Excoffon *et al.*, 2008). Otro ejemplo, es el del virus de Lassa, miembro de la familia *Arenaviridae*, que es un virus envuelto con genoma de RNA de cadena sencilla y de polaridad negativa (Albariño *et al.*, 2011). Este virus, infecta principalmente por la cara basolateral de los cultivos polarizados de células MDCK ya que su receptor se expresa primordialmente en la membrana basolateral (Schlie *et al.*, 2010). También el virus de Junin, miembro del mismo género viral que el virus de Lassa, infecta preferentemente por la cara basolateral de los cultivos polarizados de células epiteliales respiratorias humanas (Dylla *et al.*, 2008) y al igual que con el virus de Lassa su receptor viral, el receptor de la transferrina 1 (Radoshitzky *et al.*, 2007), se expresa principalmente en la cara basolateral. De igual manera, el virus de estomatitis vesicular, miembro de la

familia *Rhabdoviridae*, es un virus envuelto con genoma viral de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa que infecta preferencialmente la cara basolateral de los cultivos polarizados de células MDCK (Fuller *et al.*, 1984).

Hay que subrayar que la preferencia de la infección viral por el lado basolateral no es una generalidad de la infección viral ya que también existen diversos virus que infectan preferencialmente la cara apical. Por mencionar un ejemplo, el virus de la influenza, virus envuelto perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*, infecta principalmente por la cara apical de los cultivos polarizados de células MDCK (Roth *et al.*, 1979). Aunque no es una generalidad, se piensa que los virus que se transmiten por aerosoles o por contacto con fluidos corporales infectan por la cara apical mientras que los virus que se transmiten por rasguños o por mordidas de animales entran a las células epiteliales por el lado basolateral (Schlie *et al.*, 2010).

Las infecciones de las cepas YM y Wa, tienen diferentes sensibilidades a los tratamientos celulares con NA. Esto sugiere que las cepas utilizan diferentes receptores sializados durante su entrada. La razón es que la NA sólo corta los ácidos siálicos que se encuentran unidos de manera terminal a los diferentes receptores mientras que los ácidos siálicos subterminales se mantienen inalterados. Aunque no se puede descartar, que la cepa Wa no necesite interactuar con receptores sializados durante su entrada. La observación de que la cara basolateral de los cultivos de IPEC-J2 es más sensible a la infección por ambas cepas de rotavirus nos sugiere, que esta diferencia se debe a la expresión polarizada de receptores virales resistentes a NA, como pueden ser las integrinas o algún otro receptor aún no reportado. La caracterización de la sensibilidad en la infección de estas cepas a los tratamientos con NA se realizó principalmente en MA104 y en otras líneas celulares no polarizadas (Ciarlet y Estes, 1999; Mendez *et al.*, 1999). Por esta razón, y para comprobar la veracidad de nuestra suposición, nos interesaba ver como respondían estas cepas al infectar las diferentes caras de los cultivos polarizados de IPEC-J2 tratadas con NA.

Una observación relevante de los resultados, es que la infección de YM por

la cara apical es más sensible a los tratamientos con NA que su infección por la cara basolateral: cuando tratamos los cultivos celulares con 20 mU/ml de NA, solo disminuye la infección de la cara apical pero cuando se aumenta la concentración a 40 mU/ml la infección por la cara basolateral disminuye parcialmente mientras que la infección por la cara apical disminuye más. Una posible explicación de esta diferente sensibilidad a NA en la infección por las diferentes caras se basa en el siguiente modelo: en las células polarizadas de varias líneas celulares los ácidos siálicos se localizan en mayor proporción en la cara apical de la monocapa celular (Ciarlet *et al.*, 2001). No existen estudios de este tipo para los cultivos polarizados de IPEC-J2 pero probablemente tengan características similares. En cambio, como ya se mencionó, las integrinas y probablemente otros receptores virales se encuentran exclusivamente en la cara basolateral de las células polarizadas. Existe una hipótesis en la que se piensa que el virus al interactuar con ácidos siálicos por medio de la proteína viral VP8* sufre un cambio conformacional sutil en VP5, lo que hace más propensa a esta proteína viral a interactuar con algunas integrinas (López y Arias, 2004), por lo que la presencia de ácidos siálicos pudiera facilitar la interacción del virus con los demás receptores. En contraste, cuando el virus infecta por la cara apical solo podría, de manera inicial, interactuar con los ácidos siálicos ya que los otros receptores post-unión no se encuentran al inicio del proceso infeccioso ahí. Por ello, los ácidos siálicos en esta cara son esenciales y, por lo tanto, su sensibilidad a NA es mayor. El paso limitante de la infección por esta cara es que el virus de alguna manera no descrita, tiene que hacer posible su interacción con los demás receptores que se encuentran en la cara basolateral de las células para que pueda proseguir el proceso infeccioso. Por esta razón la infección por la cara apical es 10 veces menos efectiva.

En la cara basolateral se localizan las integrinas, con las que el virus pudiera interactuar de manera directa y no depender tan marcadamente de una interacción primaria con ácidos siálicos. También en esta cara celular pudieran localizarse otros receptores virales aun no descritos. Aun así, la interacción del virus por la cara basolateral con los ácidos siálicos potencia su

infección lo que se refleja en su ligera disminución después de los tratamientos con NA.

En contraste, la infección de la cepa Wa, por ambas caras de los cultivos celulares, fue insensible a los tratamientos con NA. Estos resultados muestran que la infección de ambas cepas virales tiene la misma sensibilidad a los tratamientos de NA cuando infectan IPEC-J2 que lo previamente reportado sobre su infección en otras líneas celulares.

La NA que se utilizó en estos experimentos se aisló de *Arthrobacter ureafaciens* y corta específicamente los ácidos siálicos terminales unidos con enlaces $\alpha(2\rightarrow3, 6, 8, 9)$. Esto implica que la cepa YM utiliza al menos un receptor sialidado, con un ácido terminal enlazado de manera $\alpha(2\rightarrow3, 6, 8, 9)$, mientras que la cepa Wa, pudiera utilizar a un receptor con ácidos siálicos subterminales. Como se mencionó en la introducción, aunque antes se pensaba que las cepas NA-resistentes no utilizaban receptores sialidados como receptores durante su entrada celular, ahora se cree que la mayoría de estas cepas de rotavirus utilizan receptores con ácidos siálicos subterminales. Estos ácidos siálicos se encuentran protegidos a los tratamientos con NA por lo que la acción de esta enzima no afectan la unión de los rotavirus NA resistentes con sus receptores sialidados. De manera específica, se ha descrito la interacción entre la proteína VP8 de la cepa Wa con el ácido siálico del acetamido-gangliósido GM1. Esta interacción es específica y no se lleva a cabo con el ácido siálico externo del gangliósido GD1a (Haselhorst *et al.*, 2009).

Después de interaccionar con los receptores virales, el virus tiene que entrar a la célula para continuar con su infección. Para ello, los virus no envueltos generalmente utilizan una vía endocítica celular. Para comenzar a caracterizar la vía endocítica utilizada por los rotavirus al infectar células polarizadas se realizaron diferentes tratamientos químicos. La entrada de los rotavirus por la cara basolateral no se ha caracterizado, por lo que se analizó el efecto de la sacarosa, la M β CD, el Dynasore, el NH₄Cl y la bafilomicina A1 tanto en la infección por la cara apical, como por la basolateral.

Se ha descrito que varias de las cepas de rotavirus utilizan la vía endocítica dependiente de clatrina para entrar a MA104 (Gutiérrez, *et al.*, 2010). De igual modo, nuestros resultados previos sugieren que la cepa YM pudiera entrar por esta misma vía cuando infecta células de la línea celular IPEC-1 no polarizadas (Cevallos, Tesis de Licenciatura, 2010). Por lo que para evaluar la importancia de esta vía endocítica en la infección por rotavirus en células polarizadas, las células se trataron con sacarosa.

Los resultados mostraron que los tratamientos con sacarosa afectaron la infección por las dos caras de los cultivos de IPEC-J2 de manera distinta: por la cara apical la infección decreció en un 70% mientras que por la cara basolateral solamente disminuyó en un 20%. Esto, pudiera ser una evidencia de que los rotavirus entran por diferentes vías endocíticas dependiendo que cara del cultivo infectan. Lo que no necesariamente significa es que los virus, para entrar por la cara apical, utilicen la vía endocítica dependiente de clatrina y que para entrar por la cara basolateral utilicen una vía independiente de clatrina. Como se mencionó en la introducción, la vía endocítica dependiente de clatrina se puede interpretar como un conjunto de vías relacionadas las cuales utilizan diferentes proteínas accesorias y están reguladas de diferente manera (Schmid y McMahon, 2007).

Se sabe que en células polarizadas, la endocitosis de la cara apical y basolateral están reguladas de manera diferente. Por ejemplo, la sobreexpresión del efector de Rab-5, Ranbankyrin-5, estimula la endocitosis de la cara apical mientras que la de la cara basolateral no se modifica (Schnatwinkel *et al.*, 2004). También se sabe que la endocitosis independiente de clatrina por la cara apical se regula de manera positiva con la activación de proteínas heterotriméricas G (Llorente *et al.*, 2000), por la activación de la proteína quinasa C, por la quinasa A (Holm *et al.*, 1995) y por la adición de calmodulina (Pryds *et al.*, 1992), y que esta regulación no modula la endocitosis por la cara basolateral. Por lo que el virus pudiera estar utilizando la misma vía endocítica para entrar por la cara apical y la basolateral pero que esta tuviera características diferentes y se regulara de manera distinta en las diferentes caras celulares.

Los rotavirus, al infectar las diferentes caras celulares, interaccionarían con los receptores virales en distintos sitios celulares y probablemente en un orden distinto, lo que pudiera estar activando distintas vías endocíticas y/o las mismas pero en proporciones distintas. Estas vías pudieran responder de manera desigual a los tratamientos de sacarosa, inhibiéndose en diferente proporción, lo que se reflejaría en la infección de los rotavirus por las diferentes caras.

Otra posibilidad es que el virus cuando infecta por la cara apical utiliza una vía endocítica sensible a los tratamientos de sacarosa, ya sea una vía endocítica dependiente de clatrina u otra vía endocítica diferente para pasar a la cara basolateral de los cultivos por medio de transcitosis y no para entrar a la célula. La transcitosis es el proceso en el que vesículas endocíticas se escinden ya sea de el lado basolateral o el apical de células polarizadas y se transfieren al lado opuesto transportando así diferentes lípidos y proteínas membranales. Este es un proceso muy importante en las células polarizadas ya que permite localizar de manera específica diferentes proteínas membranales generando así las diferentes características entre la cara basolateral y la apical de las células, las cuales están separadas por las uniones estrechas. Ya en la cara basolateral el virus pudiera interaccionar con los demás receptores y activar otra vía endocítica, con diferente sensibilidad a los tratamientos de sacarosa, que le permitiera entrar a la célula para iniciar un ciclo infeccioso

La vía endocítica dependiente de clatrina tiene un papel esencial en la localización polarizada de las proteínas de la membrana plasmática. Cuando uno inhibe la expresión de clatrina en cultivos polarizados, las células generan defectos en las vías biosintéticas y recicladoras de las proteínas basolaterales (por ejemplo el receptor de transferrina, el receptor de lipoproteínas de baja densidad, etc.) despolarizando la localización de la mayoría de estas proteínas. Sin embargo este tratamiento no modifica la localización de las proteínas en las cara apical (Deborde *et al.*, 2008). Esta despolarización, causada por inhibir la vía endocítica dependiente de clatrina, pudiera disminuir la entrada del virus a la célula al deslocalizar los receptores utilizados por el virus para entrar a la célula. Esto pudiera impedir la interacción del virus con alguno de sus receptores o disminuir

el número de receptores celulares en la membrana basolateral haciendo menos efectiva su infección por esta cara. La localización polarizada de las proteínas membranales basolaterales sea la cara principalmente afectada cuando se tratan las células con sacarosa, pudiera explicar por que la infección por la cara basolateral se inhibe más que por la cara apical.

Se ha descrito anteriormente, que la infectividad de todas las cepas de rotavirus estudiadas se afecta al disminuir la cantidad de colesterol de la membrana (Guerrero *et al.*, 2000; Isa *et al.*, 2004; Gutierrez *et al.*, 2010) en la línea celular MA104. Haciendo un tratamiento celular, previo a la infección con M β CD se redujo la infección de las cepas RRV, nar3 y Wa en más de un 90% (Guerrero *et al.*, 2000). Esta disminución tan drástica de la infección se ha atribuido a la disociación de las balsas lipídicas de la membrana celular donde se encuentran varios de los receptores celulares implicados en la entrada del virus a la célula por ejemplo el gangliósido GM1, las subunidades de las integrinas α 2 y β 3 y la proteína de choque térmico Hsc70. La presencia de estos receptores en balsas lipídicas pudiera facilitar una interacción efectiva de los receptores de rotavirus con la partícula viral (Isa *et al.*, 2004).

La distribución de las balsas lipídicas en la membrana es diferente en diferentes tipos celulares. En células epiteliales polarizadas las balsas lipídicas se encuentran principalmente en la membrana apical aunque en la membrana basolateral también hay balsas lipídicas pero en menor cantidad (Simons e Ikonen, 1997). La composición lipídica de las dos membranas es diferente, ya que la cara apical de células polarizadas está enriquecida con glucoesfingolípidos (Lingwood y Simons, 2010). También cabe mencionar que la vía endocítica dependiente de caveolina y la vía endocítica dependiente de flotilina también son dependientes a los niveles de colesterol. En células polarizadas la vía endocítica dependiente de caveolina se encuentra presente principalmente en la cara basolateral de los cultivos (Vogel *et al.*, 1998). Por estas dos razones es muy interesante estudiar la dependencia de la infección a los niveles de colesterol y ver si la infección tiene diferente sensibilidad a los tratamientos con M β CD cuando se infecta por la cara basolateral o por la cara apical.

Como se mostró en los resultados, la infección de la cepa YM de rotavirus es altamente susceptible a la depleción del colesterol de la membrana celular sin importar por cual de las dos caras de los cultivos polarizados de IPEC-J2 infecte. Este resultado sugiere que el requerimiento del colesterol en la infección por rotavirus se deba a un proceso o característica celular presente en ambas caras de los cultivos polarizados; o que la infección, no importando por que lado del cultivo comience, necesita de un mismo proceso o característica celular en algún punto de la infección por ambas caras.

La dependencia del pH ácido endosomal es una característica que comparten diversos virus. Como se mencionó en la introducción, el efecto del pH ácido puede ser directamente sobre la partícula viral, o de ser necesario para que se activen las diferentes proteasas endosomales utilizadas por el virus durante el procesamiento de su cápside viral. En ambos casos, el pH ácido es indispensable para que la partícula viral se modifique y sea capaz de penetrar la membrana endosomal hacia el citosol. Para determinar si la infección de YM requiere de la acidificación endosomal durante algún punto de su infección, los cultivos polarizados se trataron con NH_4Cl y con bafilomicina A1 previamente y durante la infección. Ambos fármacos previenen la acidificación endosomal pero tienen mecanismos de acción distintos. El NH_4Cl es una base débil, que en su forma neutra, es capaz de cruzar la membrana endosomal. Ya en los endosomas, el NH_4Cl se protona causando un aumento en el pH endosomal (Ferreira *et al.*, 2000). La bafilomicina A1 es un inhibidor específico de la H^+ -ATPasa vacuolar (Yoshimori *et al.*, 1991). La infección por la cara basolateral y por la cara apical no se modificó con los tratamientos de NH_4Cl al compararse con el control. Al tratar las células con bafilomicina A1, la infección por la cara basolateral disminuyó en aproximadamente un 50% pero la infección por la cara apical se mantuvo inalterada. En un trabajo reciente se estudió la entrada de la cepa de rotavirus RRV por la cara apical de MDCK polarizadas utilizando también NH_4Cl y bafilomicina A1 (Wolf *et al.*, 2010). De manera parecida a los resultados de este trabajo, no encontraron cambios en la infección por los tratamientos de NH_4Cl mientras que la infección disminuyó en aproximadamente un 90% por los

tratamientos con bafilomicina A1. En las células tratadas con bafilomicina A1, observaron una acumulación de partículas virales en estructuras endocíticas con Rab5 mostrando que la entrada del virus se encontraba detenida en este punto. Ya que la infección no se inhibió con los tratamientos de NH_4Cl , lo más probable es que el efecto inhibitorio en la infección causado por bafilomicina A1 no se debiera a su efecto en la acidificación endosomal si no algún efecto secundario.

Los inhibidores de la ATPasa vacuolar, como la bafilomicina A1, puede tener varios efectos secundarios como la inhibición de enzimas con actividad óptima en un pH bajo, la inhibición de la maduración endosomal, el reciclamiento defectuoso de receptores y la inhibición del eflujo de Ca^{2+} endosomal (Mercer *et al.*, 2010) lo que provoca que la concentración de este catión se mantenga elevada en estos organelos (Gerasimenko *et al.*, 1998). La concentración de Ca^{2+} afecta la estabilidad de la partícula viral, manteniéndola estable en altas concentraciones y desensamblándose en bajas concentraciones, *in vitro*. Este desensamblaje de la partícula viral también ocurre intracelularmente al disminuir la concentración de Ca^{2+} endosomal (Ruiz *et al.*, 2007) y permite el paso de los rotavirus de los endosomas hacia el citoplasma cuando se infectan células MA104 (Chemello *et al.*, 2002). Al aumentar la concentración de Ca^{2+} endosomal por medio de tratamientos con CaEGTA se inhibe la infección por rotavirus (Chamello *et al.*, 2002) y se obtienen resultados similares a los vistos con los tratamientos de bafilomicina A1 (Wolf *et al.*, 2010). Por lo que el papel inhibitorio en la infección causado por la bafilomicina A1 no se debe a la inhibición de la acidificación pero podría ser causado por un aumento de la concentración Ca^{2+} endosomal, lo que estabiliza a las partículas virales y bloquea su paso hacia el citosol lo que impide que continúe la infección.

Existen tres posibles explicaciones de por que la infección de YM por la cara basolateral de cultivos polarizados de IPEC-J2 se inhiba con los tratamientos de bafilomicina A1 mientras que por la cara apical se muestra inalterada. La primera es que los virus se internalizan en endosomas con características distintas, siendo aquellos originados por la cara apical más resistentes a los tratamientos con bafilomicina A1, en cuanto a la inhibición del

eflujo de Ca^{2+} .

La otra posibilidad es que las partículas virales de YM sean más estables que las de RRV haciéndolas menos sensibles a los cambios de Ca^{2+} endosomal. Existen diversos estudios sobre las diferencias en la estabilidad de las partículas virales de distintas cepas en cuanto a la concentración de Ca^{2+} . La concentración mínima de Ca^{2+} necesaria para desensamblar la tercera capa de la partícula viral varía de una cepa a otra y va de un rango de entre 10 nM y 900 nM (Ruiz *et al.*, 1996; Keljo y Smith, 1998). La concentración de calcio también es importante en pasos más tempranos de la infección de rotavirus. Una concentración alta de este catión en el medio celular, provocan cambios estructurales que estabilizan a las partículas virales lo que provoca un aumento en el título viral de todas las cepas de rotavirus probadas, aumentándolo de entre 2 hasta 50 veces dependiendo la cepa viral y el título viral inicial (Pando *et al.*, 2002). Estos datos muestran que la influencia del Ca^{2+} sobre las partículas virales es altamente variable en las diferentes cepas de rotavirus por lo que es probable que las cepas YM y RRV tengan diferentes sensibilidades a la concentración de este catión.

La vía de entrada de rotavirus a cultivos polarizados solo ha sido estudiada en un trabajo en el cual utilizan la línea celular MDCK como modelo y solo estudian la entrada al infectar por la cara apical. Por lo que la última posible explicación es que la línea celular IPEC-J2 responda de manera distinta a los tratamientos con bafilomicina A1. Quizás en este modelo celular el eflujo de Ca^{2+} no se modifica con los tratamientos y la inhibición de la infección por la cara basolateral se deba a el bloqueo de la maduración endosomal, al reciclamiento defectuoso de receptores en la cara apical o algún otro efecto secundario.

La vía de entrada de varias cepas de rotavirus como RRV, TFR41, Wa y UK se ha reportado como dependiente de la proteína dinamina (Gutierrez *et al.*, 2010). La dependencia a esta GTPasa se ha estudiado por medio de la mutante K44A de dinamina II que tiene una mutación en su dominio de GTPasa haciéndola disfuncional.

Utilizando una estrategia diferente, en este trabajo, utilizamos al inhibidor

Dynasore. Este fármaco actúa sobre el dominio de GTPasa de la dinamina inhibiendo de manera específica la actividad de sus 3 isoformas. Inesperadamente, la infectividad de la cepa YM no se modificó al infectar cultivos polarizados tratados con Dynasore, por ninguna de las dos caras, contradiciendo lo previamente reportado en modelos celulares no polarizados. En el trabajo de Wolf *et al.*, 2010, también se utilizó Dynasore para estudiar la entrada de RRV por la cara apical de cultivos polarizados de MDCK. Similar a los resultados de este trabajo no se observó una inhibición en la infección de esta cepa al inhibir dinamina por Dynasore.

Para ver si la heterogeneidad de los resultados sobre la dependencia de la dinamina en la entrada de rotavirus en cultivos polarizados y no polarizados eran causadas por las características de las diferentes líneas celulares estudiadas o por las estrategias empleadas para inhibir la dinamina se probó el efecto de Dynasore sobre la infección de RRV en células MA104. La infección de la cepa RRV en células MA104 es el modelo más estudiado del campo y se sabe que su entrada se bloquea con la mutante K44A de dinamina II por lo que era interesante ver el efecto de Dynasore en su infección. Sorprendentemente, la infección de RRV no se inhibió con las concentraciones óptimas para este inhibidor (100 μM) resultados que coinciden con los del trabajo de Wolf *et al.*, 2010. Se probaron mayores concentraciones de Dynasore y a una concentración 4 veces mayor de la óptima (400 μM) la infección de RRV en MA104 disminuyó en aproximadamente un 40%. A esta concentración tan alta el efecto inhibitorio de la infección pudiera deberse a los efectos secundarios o a la toxicidad celular. Además, esta disminución es menor a la reportada utilizando la mutante K44A, ya que con esta mutante la infección se disminuye en un 80%. Para descartar que la falta de efecto del Dynasore en la infección de rotavirus se debiera a que el fármaco no estuviera inhibiendo a la dinamina por pérdida de actividad o alguna otra razón, se estudió la endocitosis de la transferrina en células MA104 tratadas con este fármaco. Estos tratamientos bloquearon la endocitosis de la transferrina en células MA104 tratadas con este inhibidor, al contrario del control sin tratamiento, mostrando que el fármaco se encuentra activo y actúa de la manera

esperada.

En una primera aproximación, podríamos suponer que la mutante de la dinamina K44A y la dinamina inhibida por el fármaco Dynasore debieran tener un fenotipo similar puesto que ambas actúan sobre el dominio de GTPasa. Sin embargo, esto no sucede así probablemente por la naturaleza misma de las técnicas y al tiempo en que producen su efecto: la inhibición por Dynasore ocurre rápidamente (agregándose al medio de cultivo tan solo una hora antes de infectar) por lo que sólo debiera tener un efecto directo en la inhibición de las vías endocíticas dependientes de dinamina durante la entrada del virus. En cambio, la inhibición de la dinamina por medio de la mutante K44A ocurre durante varias horas o incluso días, lo que pudiera causar efectos secundarios en la célula que inhibieran la infección del virus, como por ejemplo la relocalización de los receptores con los cuales interacciona el virus durante su entrada. Otra posible explicación pudiera ser causada por las propiedades físicas de ambas moléculas inhibitorias. El fármaco Dynasore es una molécula pequeña que interactúa directamente con el sitio de GTPasa de dinamina, mientras que la mutante K44A puede interactuar con varias proteínas implicadas en las vías endocíticas celulares por lo que esta enzima al estar expresada a niveles más altos de los naturales, pudiera bloquear otros procesos endocíticos importantes durante la entrada viral. Por el momento no es claro a que se deban estas diferencias en la infección y solo puedo concluir que la infección de YM tanto por la cara apical como por la cara basolateral de cultivos polarizados de IPEC-J2 es independiente de dinamina.

Por último en este trabajo estudiamos la salida de la progenie viral en células polarizadas. Aunque los rotavirus infectan de manera más efectiva por la cara basolateral de los cultivos polarizados, al terminar el ciclo infeccioso, su salida se da principalmente por el cara apical. Se ha observado anteriormente que la cepa RRV durante su infección en células polarizadas Caco-2, también se libera principalmente por la cara apical y su liberación depende de la actividad de actina (Gardel *et al.*, 2007). Por otro lado, la infección de la misma cepa en células no polarizadas MA104 se libera indiscriminadamente por ambas caras por

consecuencia de un efecto citopático (Jourdan *et al.*, 1997).

Los resultados también mostraron que, sin importar por que cara de los cultivos polarizados infecte el virus, éstos se liberan por la cara apical, por lo que probablemente compartan el mismo desarrollo de la infección en pasos posteriores de la entrada a la célula. La salida polarizada de los rotavirus, tampoco parece depender de la MOI utilizada en las infecciones ya que en ambos casos, se liberaron mas partículas virales infecciosas por la cara apical. Al infectar con una MOI de 10 el efecto en la disminución de la TER fue mayor y ocurrió más rápidamente que cuando se infectó con una MOI de 0.1 (100 veces menor). Sin embargo, no queda claro si, el virus utiliza una vía exocítica para salir de la célula o si se libera por lisis celular en una infección normal. Se ha descrito previamente que durante la infección por RRV, utilizando una MOI de 10, en cultivos polarizados de Caco-2, el virus utiliza una vía no convencional de transporte vesicular para salir de la célula. La TER de estas células no se modificó durante las primeras 24 horas post-infección pero bajó aproximadamente a la mitad a las 48 horas y se abatió totalmente a las 72 horas. La mayoría del virus se liberó durante las primeras 24 post-infección antes de que se diera la lisis celular la cual comenzó a las 48 horas post infección (Jourdan *et al.*, 1997).

Al infectar con una MOI de 0.1, parecería que los virus no producen lisis para liberarse de la célula y sólo empieza a evidenciarse a las 72 horas post infección. Incluso pequeñas heridas o huecos en la monocapa celular son suficientes para disminuir la TER drásticamente por lo que a esta MOI la liberación viral parece no ser un efecto de lisis celular. Una posible explicación de la disminución de la TER a las 72 horas pudiera deberse a nuevos ciclos infecciosos causados por progenie viral generada y liberada durante el experimento, aunque es poco probable ya que las partículas liberadas durante el primer ciclo infeccioso no son capaces de reinfectar el cultivo de nuevo de manera eficiente y generar mas ciclos infeccioso significativos ya que los cultivos no contienen tripsina. Esta proteasa como se mencionó en la introducción, corta la proteína VP4 generando a las proteínas VP8* y VP5*, lo cual activa al virus haciéndolo infeccioso. Por esta razón, la disminución en la TER no debe ser

debida al daño acumulativo por posteriores ciclos infecciosos si no a la producción y la acumulación de la toxina viral NSP4. En cambio, cuando uno infecta con una MOI de 10 son mas virus de los que se necesitan para infectar el 100% de la monocapa. En estas condiciones la TER si baja casi totalmente a las 18 horas y la monocapa muestra daño evidente al inspeccionarse con el microscopio lo cual encajaría mas con una hipótesis de liberación viral por lisis celular. Estas condiciones de infección se alejan bastante de lo que ocurre en una infección viral *in vivo* ya que en el contexto natural la concentración de virus que comienzan una infección no es tan alta. El reto celular en esta situación es mucho mayor por lo que el daño se genera más pronto y es más evidente. Infectar con MOIs tan altas provoca que la concentración de NSP4 llegue a niveles más elevados más rápidamente, lo cual aumenta el daño a la monocapa celular. Para concluir estos últimos resultados, parecería que la cepa YM no se libera por lisis celular cuando infecta cultivos polarizados IPEC-J2, resultado que se observa cuando se infecta con una MOI de 0.1. Al parecer mientras prosigue la infección, sí hay una lisis celular, que pudiera ser necesaria para una eficiente infección o simplemente ser una consecuencia de la infección. Los reovirus, miembro junto con Rotavirus de la familia *Reoviridae*, muestran un comportamiento similar a los Rotavirus cuando infectan células epiteliales polarizadas de un cultivo primario de vías áreas humanas, ya que infectan con mayor eficiencia la cara basolateral y la salida se da principalmente por la cara apical de estos cultivos celulares (Excoffon *et al.*, 2008).

Existe una tendencia en la que se ve que los virus que salen por la cara apical generan infecciones locales mientras que los virus que se liberan por la cara basolateral generan infecciones sistémicas (Schlie *et al.*, 2010). La mayoría de las infecciones por rotavirus se desarrollan como infecciones locales aunque existe cada vez mas evidencias de infecciones sistémicas en diferentes modelos de estudio. En varios casos clínicos se han encontrado rotavirus fuera del intestino, principalmente en el hígado, donde son capaces de generar daño hepático de diferentes magnitudes (Carlson *et al.*, 1978; Kovacs *et al.*, 1986; Gilger *et al.*, 1992). También se ha relacionado la infección de rotavirus con el sistema

nervioso (Keidan *et al.*, 1992; Nishimura *et al.*, 1993) aunque no es claro si la presencia del virus fue por una contaminación durante el muestreo o por una infección del sistema nervio central, aunque un estudio sugiere que sí hubo una infección (Lynch *et al.*, 2001). En ratones se ha visto que los rotavirus son capaces de propagarse del intestino después de una infección por la vía oral a la lamina propia, a los parches de Peyer, a los nódulos linfáticos mesentéricos, a los pulmones, al hígado, a los riñones y al ducto biliar (Ramig, 2004). La antigenemia y viremia parecen ser eventos comunes en los modelos animales y los humanos enfermos con rotavirus pero las secuelas sistémicas infecciosas causadas por esta viremia son raras (Mossel y Ramig, 2002; Mossel y Ramig, 2003). Aun no se conoce que factores provocan o favorecen que se desarrolle una infección sistémica de rotavirus.

CONCLUSIÓN

En conclusión, estudiar la infección de los rotavirus en la línea celular IPEC-J2, permitió caracterizar aspectos de la infección que no se pueden estudiar en líneas celulares no intestinales e incapaces de polarizarse. Utilizando este modelo celular, se observó que la cara basolateral de estas células es más sensible que la cara apical a la infección por ambas cepas de los rotavirus sin importar su sensibilidad a NA. Esta mayor sensibilidad a la infección de la cara basolateral probablemente se deba a la distribución polarizada de los receptores virales necesarios para la entrada como sugieren los resultados de que las células con la membrana basolateral descubierta por medio de un raspón son más sensibles a la infección. Para corroborar esta suposición se puede buscar la localización de los diferentes receptores virales en los cultivos polarizados de IPEC-J2 al marcarlos con fluorescencia y observarlos en un corte del plano y-x por microscopia confocal. Otra posibilidad, puede ser que existan diferencias en la actividad de las vías endocíticas utilizadas por el virus durante su entrada por las diferentes caras de las células polarizadas.

La vía endocítica utilizada por la cepa YM para entrar a la célula por la cara apical y basolateral tiene características similares en cuanto al efecto de los diferentes fármacos utilizados en este trabajo. La entrada del virus por las dos caras comparte varias características: parece ser independiente de dinamina, no necesita la acidificación endosomal y es sensible a los niveles de colesterol de la membrana. Sin embargo existen algunas diferencias entre la entrada de los rotavirus por la cara apical y por la cara basolateral: la infección por la cara apical disminuye con la inhibición de la vía endocítica dependiente de clatrina con los tratamientos de sacarosa mientras que por la cara basolateral se ve apenas disminuida y los tratamientos con bafilomicina A1 disminuyen la infección por la cara basolateral probablemente por un aumento en la concentración de Ca^{2+} endosomal. Estos resultados, muestran varias de las características de la entrada de los rotavirus en este modelo pero para determinar que vía endocítica es la

utilizada en las diferentes caras celulares se pueden realizar silenciamientos de la proteínas clatrina, caveolina y flotilina, y ver el efecto que esto tiene en la infección del virus. También sería interesante probar las diferentes mutantes dominantes negativas de dinamina que disminuyeron la infección de la cepa RRV en MA104 ya que en este modelo la dinamina parece no participar durante la entrada. opciones posibilidades

Hay tres formas en que los resultados antes mencionados pudieran explicar lo que ocurre durante una infección *in vivo*: la primera es que los rotavirus interaccionan únicamente con los ácidos siálicos localizados en la cara apical celular. Después, de alguna manera que aun no se conoce, activarían su internalización a la célula por endocitosis comenzando así su infección (figura 31). Esta sería la forma menos eficiente para que el virus entrara a la célula, ya que la cara apical celular es poco sensible a la infección de rotavirus. Es posible que la razón de que esto suceda sea que las integrinas que utiliza el virus como receptor se encuentren localizadas exclusivamente en la cara basolateral celular.

La segunda forma de explicar los resultados es argüir que el rotavirus primero interacciona con los ácidos siálicos de la membrana apical y que luego abra las uniones estrechas celulares por medio de la proteína VP8 (Nava et al., 2004) y/o la proteína NSP4 (Tafazoli *et al.*, 2001) (secretada por una célula ya infectada). Al abrir las uniones estrechas, los receptores virales, localizados en la cara basolateral se relocalizarían en la cara apical (Nava et al., 2004). Permitiendo así que el virus interaccione con ellos, facilitando su entrada por la cara apical (figura 32). La apertura de las uniones estrechas también pudiera permitir al virus acceder al lado basolateral del tejido, interaccionar con sus demás receptores y entrar por esta cara celular. Esta forma de entrada viral en los cultivos polarizados, también está reportada en un subgrupo de los cocackievirus B. Estos virus se unen con el receptor del factor de decaimiento acelerado anclado a GPIs que se encuentran en la cara apical de las células; esto activa una cascada de señalizaciones que abren las uniones estrechas y permiten que el virus interaccione con el receptor CAR, que se encuentra en la cara basolateral (Coyne y Bergelson, 2006).

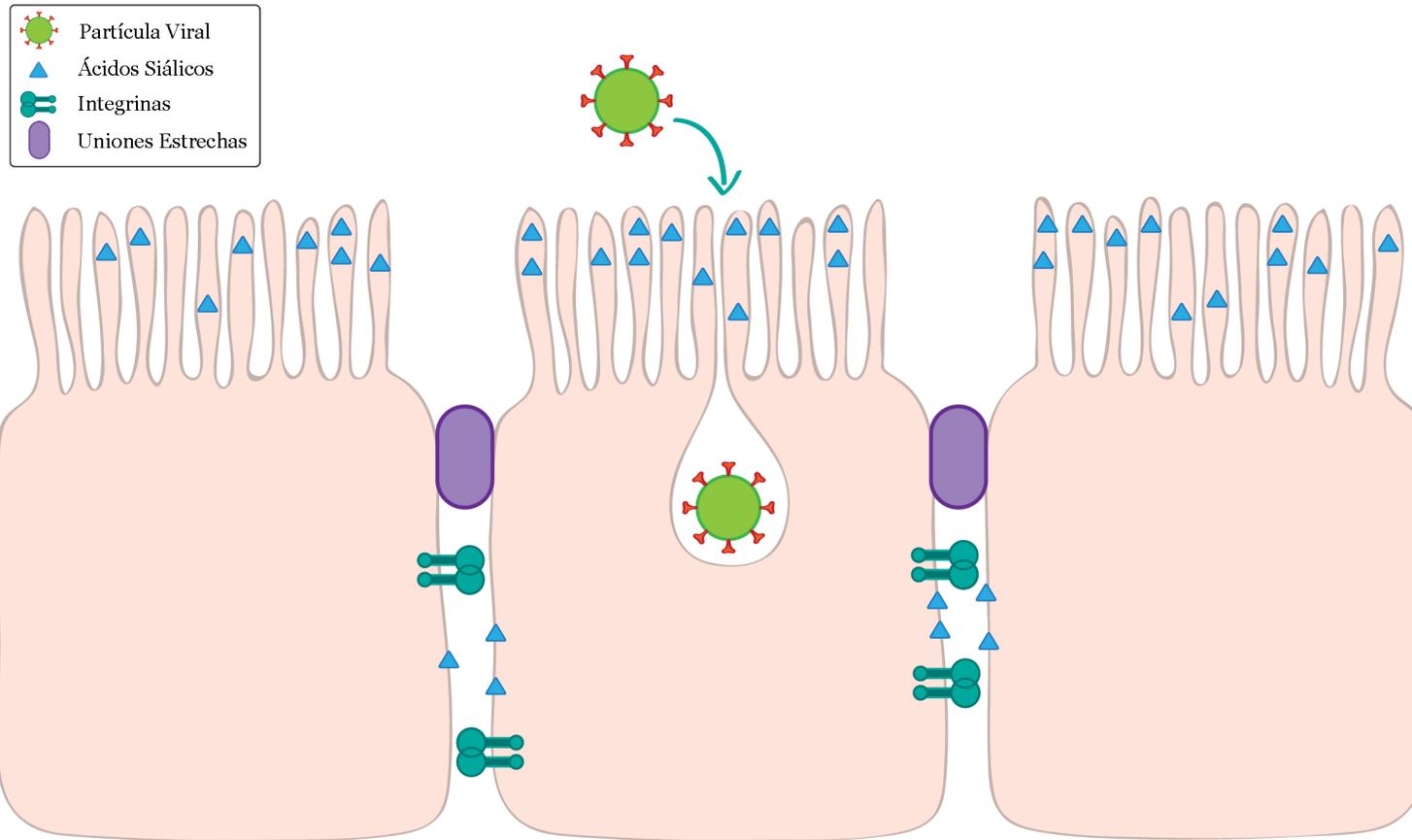


Figura 31. Modelo gráfico de la entrada apical de los rotavirus durante una infección. La partícula viral interactúa únicamente con los ácidos siálicos apicales, entrando ineficientemente a la célula por esta cara celular.

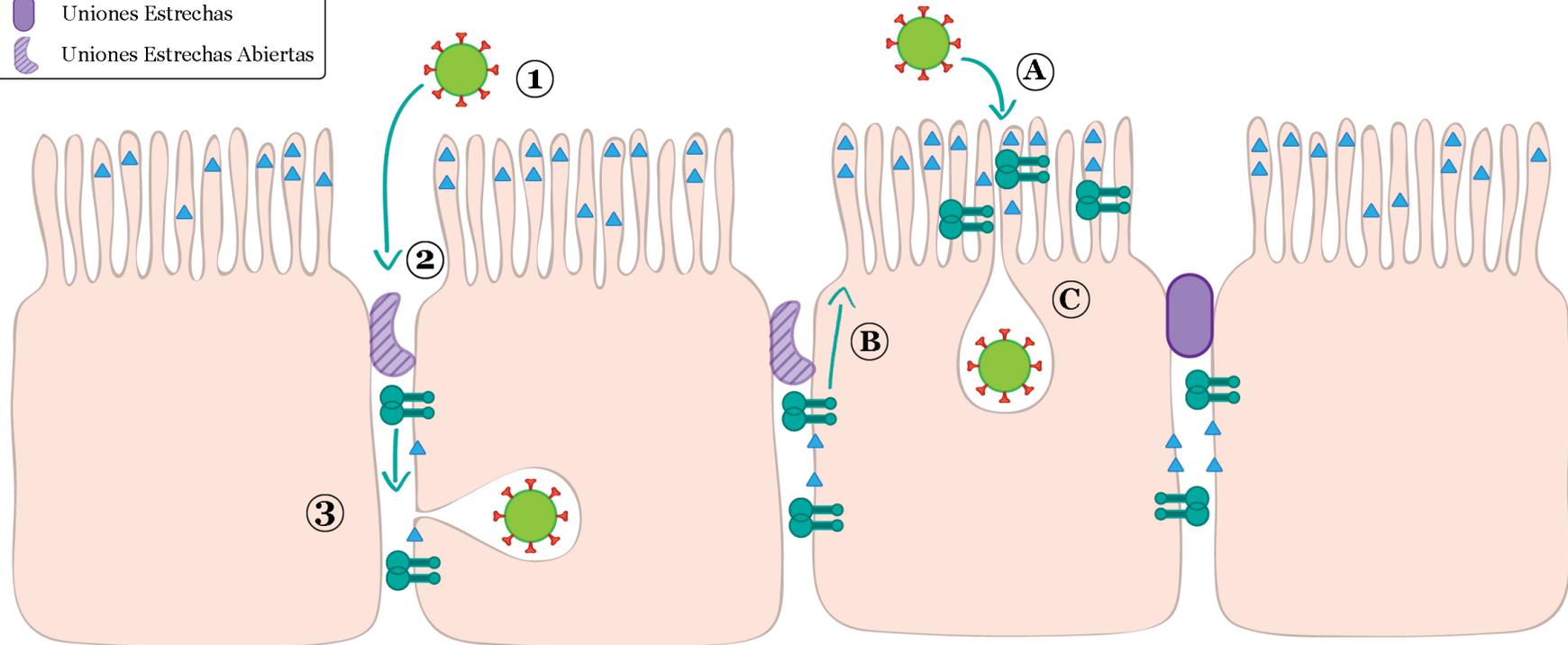
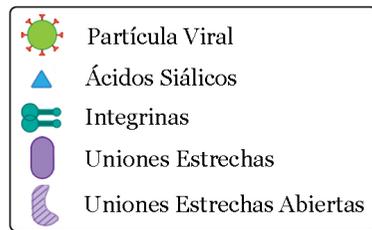


Figura 32. Modelo gráfico de la entrada de los rotavirus al abrir las uniones estrechas. En lado izquierdo del modelo, **1)** el virus interacciona con los ácidos siálicos apicales y **2)** abre las uniones estrechas. **3)** Esto permite el paso del virus a la cara basolateral donde interacciona con los demás receptores virales lo que le permite entrar por esa cara celular. En el lado derecho del modelo, **A)** el virus interacciona con los ácidos siálicos apicales y abre las uniones estrechas. **B)** esto permite que las integrinas y algún otro posible receptores basolateral migre a la cara apical. **C)** Después el virus interacciona con sus demás receptores celulares para entrar por la cara apical.

La tercera forma de explicar nuestras observaciones es suponer que el tejido se encuentra dañado por alguna infección anterior o por cualquier otra razón, y descubra la cara basolateral de varias células, facilitando así la entrada del rotavirus. Además, la lesión podría permitir la localización de los receptores basolaterales a la cara apical, y de esta forma permitiría que los rotavirus se internalizaran en la célula por esta cara (figura 33). Los resultados no nos permiten saber si la vía endocítica utilizada por el virus para entrar por la cara basolateral y por la cara apical, es la misma o si es diferente, pero en ambos casos la vía endocítica es independiente a dinamina.

Después de entrar a la célula y llevar a cabo su ciclo infeccioso, la mayoría de las partículas virales infecciosas se liberaron por la cara apical de los cultivos polarizados sin importar la MOI utilizada en los experimentos. La TER de los cultivos en este experimento se mantuvo elevada durante una gran parte del tiempo de los experimentos y el número de partículas infecciosas en el medio apical y basolateral nunca llegó a una concentración similar resultados que sugieren que la liberación del virus se lleva a cabo por un transporte activo y no por lisis celular como se ha visto con varios modelos celulares no polarizados (Susuki *et al.*, 1984; Musalem y Espejo, 1985). La cepa RRV, cuando infecta células Caco-2 polarizadas, sale por la cara apical a través de un transporte vesicular y no requiere de lisis celular (Jourdan *et al.*, 1997) por lo que probablemente, en la infección por YM de células IPEC-J2 polarizadas, la liberación viral ocurra por un proceso similar. Para determinar cual de estas dos alternativas es la que ocurre en este modelo, se puede medir la liberación de LDH al medio extracelular ya que es un indicativo del nivel de daño o de muerte celular de los cultivos celulares.

Este trabajo muestra el gran potencial que tiene esta línea celular para estudiar la infección por rotavirus ya que permiten investigar aspectos de la infección que únicamente se pueden estudiar en células polarizadas. Aparte por su origen intestinal la hace un modelo que comparte muchas características con el hospedero natural disminuyendo el riesgo de obtener resultados distintos de lo que ocurre en una infección naturales un animal completo. También los

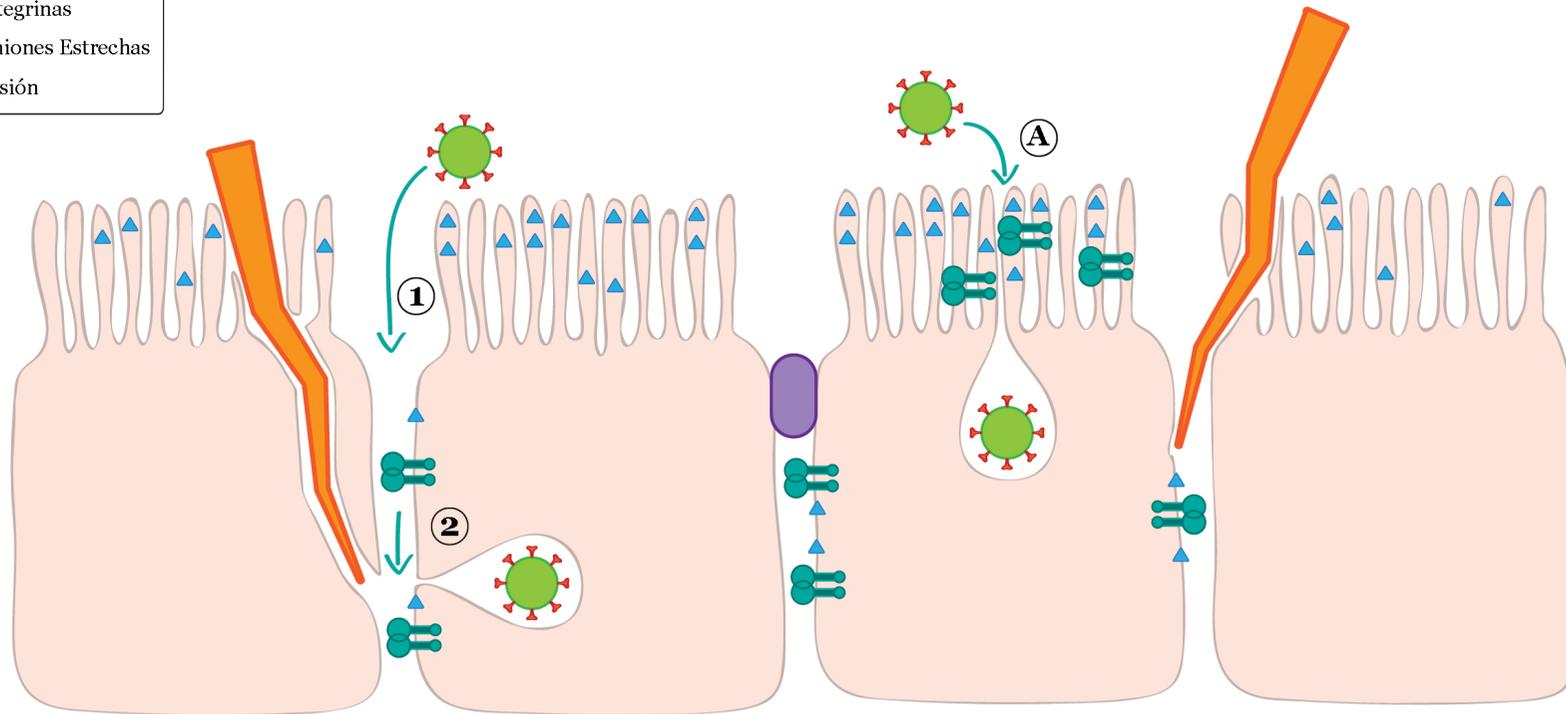
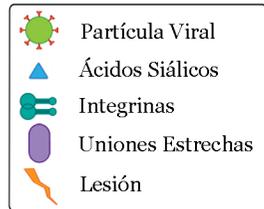


Figura 33. Modelo gráfico de la entrada de los rotavirus en un tejido lesionado. En lado izquierdo del modelo, se muestra una célula con la cara basolateral descubierta por una lesión. **1)** El virus es capaz de acceder a la cara basolateral celular e **2)** interactuar con las integrinas lo que le permite entrar a la célula por su cara basolateral. En el lado derecho, debido a la lesión, **A)** algunos los receptores basolaterales se mueven a la cara apical donde el virus interacciona con ellos para entrar por esta cara célula.

resultados aportan nuevos datos sobre la infección de rotavirus en células polarizadas proceso de gran interés que todavía se encuentra muy poco caracterizado.

BIBLIOGRAFÍA

Albariño, C. G., Bird, B. H., Chakrabarti, A. K., Dodd, K. A., Erickson, B. R. and Nichol, S. T. (2011). Efficient rescue of recombinant Lassa virus reveals the influence of S segment noncoding regions on virus replication and virulence. *J Virol* **85**, 4020-4.

Arias, C., Romero, P., Alvarez, V. and López, S. (1996). Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol* **70**, 5832-9.

Aït-Slimane, T., Galmes, R., Trugnan, G. and Maurice, M. (2009). Basolateral internalization of GPI-anchored proteins occurs via a clathrin-independent flotillin-dependent pathway in polarized hepatic cells. *Mol Biol Cell* **20**, 3792-800.

Babuke, T. and Tikkanen, R. (2007). Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *Eur J Cell Biol* **86**, 525-32.

Bernstein, E., Caudy, A., Hammond, S. and Hannon, G. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-6.

Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. and Rouillé, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **80**, 6964-72.

Bowman, E. J., Siebers, A. and Altendorf, K. (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7972-6.

Brown, D. R. and Price, L. D. (2007). Characterization of Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 invasion in an epithelial cell line (IPEC J2) from porcine small intestine. *Vet Microbiol* **120**, 328-33.

Bugarcic, A. and Taylor, J. A. (2006). Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 is secreted from the apical surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol* **80**, 12343-9.

Carlson, J. A., Middleton, P. J., Szymanski, M. T., Huber, J. and Petric, M. (1978). Fatal rotavirus gastroenteritis: an analysis of 21 cases. *Am J Dis Child* **132**, 477-9.

Chandran, K., Sullivan, N. J., Felbor, U., Whelan, S. P. and Cunningham, J. M. (2005). Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* **308**, 1643-5.

Chappie, J. S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S. L. and Dyda, F. (2010). G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature* **465**, 435-40.

Chen, C. and Zhuang, X. (2008). Epsin 1 is a cargo-specific adaptor for the clathrin-mediated endocytosis of the influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11790-5.

Ciarlet, M., Crawford, S. and Estes, M. (2001). Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. *J Virol* **75**, 11834-50.

Ciarlet, M., Crawford, S. E., Cheng, E., Blutt, S. E., Rice, D. A., Bergelson, J. M. and Estes, M. K. (2002a). VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. *J Virol* **76**, 1109-

23.

Ciarlet, M. and Estes, M. (1999). Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J Gen Virol* **80** (Pt 4), 943-8.

Ciarlet, M., Ludert, J., Iturriza-Gómara, M., Liprandi, F., Gray, J., Desselberger, U. and Estes, M. (2002b). Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *J Virol* **76**, 4087-95.

Coulson, B. S., Londrigan, S. L. and Lee, D. J. (1997). Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5389-94.

Coyne, C. B. and Bergelson, J. M. (2006). Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* **124**, 119-31.

Cremona, M. L., Matthies, H. J., Pau, K., Bowton, E., Speed, N., Lute, B. J., Anderson, M., Sen, N., Robertson, S. D., Vaughan, R. A. et al. (2011). Flotillin-1 is essential for PKC-triggered endocytosis and membrane microdomain localization of DAT. *Nat Neurosci* **14**, 469-77.

Crespo, P. M., von Muhlinen, N., Iglesias-Bartolomé, R. and Daniotti, J. L. (2008). Complex gangliosides are apically sorted in polarized MDCK cells and internalized by clathrin-independent endocytosis. *FEBS J* **275**, 6043-56.

Cuadras, M. A. and Greenberg, H. B. (2003). Rotavirus infectious particles use lipid rafts during replication for transport to the cell surface in vitro and in vivo. *Virology* **313**, 308-21.

Damm, E., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T. and Helenius, A. (2005). Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol* **168**, 477-88.

Danthi, P., Guglielmi, K. M., Kirchner, E., Mainou, B., Stehle, T. and Dermody, T. S. (2010). From touchdown to transcription: the reovirus cell entry pathway. *Curr Top Microbiol Immunol* **343**, 91-119.

Deborde, S., Perret, E., Gravotta, D., Deora, A., Salvarezza, S., Schreiner, R. and Rodriguez-Boulan, E. (2008). Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature* **452**, 719-23.

Desselberger, U., Manktelow, E., Li, W., Cheung, W., Iturriza-Gómara, M. and Gray, J. (2009). Rotaviruses and rotavirus vaccines. *Br Med Bull.*

Diesing, A. K., Nossol, C., Panther, P., Walk, N., Post, A., Kluess, J., Kreutzmann, P., Dänicke, S., Rothkötter, H. J. and Kahlert, S. (2011). Mycotoxin deoxynivalenol (DON) mediates biphasic cellular response in intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2. *Toxicol Lett* **200**, 8-18.

Doherty, G. and McMahon, H. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* **78**, 857-902.

Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F. et al. (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* **293**, 2449-52.

Dröse, S., Bindseil, K. U., Bowman, E. J., Siebers, A., Zeeck, A. and Altendorf, K. (1993). Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosinetriphosphatases. *Biochemistry* **32**, 3902-6.

- Dylla, D. E., Michele, D. E., Campbell, K. P. and McCray, P. B.** (2008). Basolateral entry and release of New and Old World arenaviruses from human airway epithelia. *J Virol* **82**, 6034-8.
- Ebert, D. H., Deussing, J., Peters, C. and Dermody, T. S.** (2002). Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J Biol Chem* **277**, 24609-17.
- Edeling, M., Smith, C. and Owen, D.** (2006). Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 32-44.
- Elbashir, S., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T.** (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8.
- Estes, M., Graham, D. and Mason, B.** (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J Virol* **39**, 879-88.
- Excoffon, K. J., Guglielmi, K. M., Wetzell, J. D., Gansemer, N. D., Campbell, J. A., Dermody, T. S. and Zabner, J.** (2008). Reovirus preferentially infects the basolateral surface and is released from the apical surface of polarized human respiratory epithelial cells. *J Infect Dis* **197**, 1189-97.
- Ferreira, D. F., Santo, M. P., Rebello, M. A. and Rebello, M. C.** (2000). Weak bases affect late stages of Mayaro virus replication cycle in vertebrate cells. *J Med Microbiol* **49**, 313-8.
- Ford, M. G., Jenni, S. and Nunnari, J.** (2011). The crystal structure of dynamin. *Nature* **477**, 561-6.
- Fra, A., Williamson, E., Simons, K. and Parton, R.** (1995). De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8655-9.
- Frick, M., Bright, N., Riento, K., Bray, A., Merrified, C. and Nichols, B.** (2007). Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Curr Biol* **17**, 1151-6.
- Fuller, S., von Bonsdorff, C. H. and Simons, K.** (1984). Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the polarized epithelial cell line, MDCK. *Cell* **38**, 65-77.
- Gardet, A., Breton, M., Trugnan, G. and Chwetzoff, S.** (2007). Role for actin in the polarized release of rotavirus. *J Virol* **81**, 4892-4.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R. W., Knossow, M. and Flamand, A.** (1993). Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *J Virol* **67**, 1365-72.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Durrer, P., Brunner, J., Flamand, A. and Ruigrok, R.** (1999). Rabies virus-induced membrane fusion. *Mol Membr Biol* **16**, 21-31.
- Ge, L., Qi, W., Wang, L. J., Miao, H. H., Qu, Y. X., Li, B. L. and Song, B. L.** (2011). Flotillins play an essential role in Niemann-Pick C1-like 1-mediated cholesterol uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 551-6.
- Gerasimenko, J. V., Tepikin, A. V., Petersen, O. H. and Gerasimenko, O. V.** (1998). Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. *Curr Biol* **8**, 1335-8.
- Gilger, M. A., Matson, D. O., Conner, M. E., Rosenblatt, H. M., Finegold, M. J. and Estes, M. K.** (1992). Extraintestinal rotavirus infections in

children with immunodeficiency. *J Pediatr* **120**, 912-7.

Glebov, O., Bright, N. and Nichols, B. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* **8**, 46-54.

Gonzalez-Vallina, R., Wang, H., Zhan, R., Berschneider, H., Lee, R., Davidson, N. and Black, D. (1996). Lipoprotein and apolipoprotein secretion by a newborn piglet intestinal cell line (IPEC-1). *Am J Physiol* **271**, G249-59.

Graham, K. L., Halasz, P., Tan, Y., Hewish, M. J., Takada, Y., Mackow, E. R., Robinson, M. K. and Coulson, B. S. (2003). Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *J Virol* **77**, 9969-78.

Guerrero, C., Zárate, S., Corkidi, G., López, S. and Arias, C. (2000). Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J Virol* **74**, 9362-71.

Guerrero, C. A., Bouyssounade, D., Zárate, S., Isa, P., López, T., Espinosa, R., Romero, P., Méndez, E., López, S. and Arias, C. F. (2002). Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J Virol* **76**, 4096-102.

Guinea, R. and Carrasco, L. (1995). Requirement for vacuolar proton-ATPase activity during entry of influenza virus into cells. *J Virol* **69**, 2306-12.

Guo, C., Nakagomi, O., Mochizuki, M., Ishida, H., Kiso, M., Ohta, Y., Suzuki, T., Miyamoto, D., Hidari, K. and Suzuki, Y. (1999). Ganglioside GM(1a) on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. *J Biochem* **126**, 683-8.

Gutiérrez, M., Isa, P., Sánchez-San Martín, C., Pérez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C. F. and López, S. (2010). Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **84**, 9161-9.

Haegebarth, A., Bie, W., Yang, R., Crawford, S., Vasioukhin, V., Fuchs, E. and Tyner, A. (2006). Protein tyrosine kinase 6 negatively regulates growth and promotes enterocyte differentiation in the small intestine. *Mol Cell Biol* **26**, 4949-57.

Hansen, C. and Nichols, B. (2009). Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci* **122**, 1713-21.

Hansen, S., Sandvig, K. and van Deurs, B. (1993). Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J Cell Biol* **121**, 61-72.

Haselhorst, T., Fleming, F., Dyason, J., Hartnell, R., Yu, X., Holloway, G., Santegoets, K., Kiefel, M., Blanchard, H., Coulson, B. et al. (2009). Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nat Chem Biol* **5**, 91-3.

Helenius, A., Kartenbeck, J., Simons, K. and Fries, E. (1980). On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *J Cell Biol* **84**, 404-20.

Henley, J. R., Krueger, E. W., Oswald, B. J. and McNiven, M. A. (1998). Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* **141**, 85-99.

Herreros, J., Ng, T. and Schiavo, G. (2001). Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell* **12**, 2947-60.

Hewish, M. J., Takada, Y. and Coulson, B. S. (2000). Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol* **74**, 228-36.

Hinnebusch, B., Henderson, J., Siddique, A., Malo, M., Zhang, W., Abedrapo, M. and Hodin, R. (2003). Transcriptional activation of the enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase is associated with changes in the acetylation state of histone H3 at a specific site within its promoter region in vitro. *J Gastrointest Surg* **7**, 237-44; discussion 244-5.

Hinrichsen, L., Meyerholz, A., Groos, S. and Ungewickell, E. (2006). Bending a membrane: how clathrin affects budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8715-20.

Holm, P. K., Eker, P., Sandvig, K. and van Deurs, B. (1995). Phorbol myristate acetate selectively stimulates apical endocytosis via protein kinase C in polarized MDCK cells. *Exp Cell Res* **217**, 157-68.

Huss, M. and Wieczorek, H. (2009). Inhibitors of V-ATPases: old and new players. *J Exp Biol* **212**, 341-6.

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

Johannsdottir, H. K., Mancini, R., Kartenbeck, J., Amato, L. and Helenius, A. (2009). Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry. *J Virol* **83**, 440-53.

Jourdan, N., Maurice, M., Delautier, D., Quero, A. M., Servin, A. L. and Trugnan, G. (1997). Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J Virol* **71**, 8268-78.

Kaljot, K., Shaw, R., Rubin, D. and Greenberg, H. (1988). Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol* **62**, 1136-44.

Kandil, H. M., Argenzio, R. A., Chen, W., Berschneider, H. M., Stiles, A. D., Westwick, J. K., Rippe, R. A., Brenner, D. A. and Rhoads, J. M. (1995). L-glutamine and L-asparagine stimulate ODC activity and proliferation in a porcine jejunal enterocyte line. *Am J Physiol* **269**, G591-9.

Keidan, I., Shif, I., Keren, G. and Passwell, J. H. (1992). Rotavirus encephalopathy: evidence of central nervous system involvement during rotavirus infection. *Pediatr Infect Dis J* **11**, 773-5.

Keljo, D. J. and Smith, A. K. (1988). Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **7**, 249-56.

Kirchhausen, T., Macia, E. and Pelish, H. (2008). Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Methods Enzymol* **438**, 77-93.

Kirkham, M., Fujita, A., Chadda, R., Nixon, S. J., Kurzchalia, T. V., Sharma, D. K., Pagano, R. E., Hancock, J. F., Mayor, S. and Parton, R. G. (2005). Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J Cell Biol* **168**, 465-76.

Koh, S. Y., George, S., Brözel, V., Moxley, R., Francis, D. and Kaushik, R. S. (2008). Porcine intestinal epithelial cell lines as a new in vitro model for studying adherence and pathogenesis of enterotoxigenic Escherichia coli. *Vet Microbiol* **130**, 191-7.

Kovacs, A., Chan, L., Hotrakitya, C., Overturf, G. and Portnoy, B. (1986). Serum transaminase elevations in infants with rotavirus gastroenteritis. *J*

Pediatr Gastroenterol Nutr **5**, 873-7.

Kumari, S., Mg, S. and Mayor, S. (2010). Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res* **20**, 256-75.

Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A. and Dautry-Varsat, A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* **7**, 661-71.

Leng, S., Lu, S., Yao, Y., Kan, Z., Morris, G. S., Stair, B. R., Cherny, M. A. and Black, D. D. (2007). Hepatocyte nuclear factor-4 mediates apolipoprotein A-IV transcriptional regulation by fatty acid in newborn swine enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G475-83.

Lingwood, D. and Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50.

Liu, B., Yin, X., Feng, Y., Chambers, J. R., Guo, A., Gong, J., Zhu, J. and Gyles, C. L. (2010a). Verotoxin 2 enhances adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to intestinal epithelial cells and expression of β 1-integrin by IPEC-J2 cells. *Appl Environ Microbiol* **76**, 4461-8.

Liu, F., Li, G., Wen, K., Bui, T., Cao, D., Zhang, Y. and Yuan, L. (2010b). Porcine small intestinal epithelial cell line (IPEC-J2) of rotavirus infection as a new model for the study of innate immune responses to rotaviruses and probiotics. *Viral Immunol* **23**, 135-49.

Llorente, A., van Deurs, B., Garred, O., Eker, P. and Sandvig, K. (2000). Apical endocytosis of ricin in MDCK cells is regulated by the cyclooxygenase pathway. *J Cell Sci* **113** (Pt 7), 1213-21.

Lu, S., Yao, Y., Cheng, X., Mitchell, S., Leng, S., Meng, S., Gallagher, J. W., Shelness, G. S., Morris, G. S., Mahan, J. et al. (2006). Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size. *J Biol Chem* **281**, 3473-83.

Lu, S., Yao, Y., Meng, S., Cheng, X. and Black, D. D. (2002). Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid transport in newborn swine intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **277**, 31929-37.

Lynch, M., Lee, B., Azimi, P., Gentsch, J., Glaser, C., Gilliam, S., Chang, H. G., Ward, R. and Glass, R. I. (2001). Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review. *Clin Infect Dis* **33**, 932-8.

López, S. and Arias, C. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol* **12**, 271-8.

Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C. and Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* **10**, 839-50.

Mariani, V., Palermo, S., Fiorentini, S., Lanubile, A. and Giuffra, E. (2009). Gene expression study of two widely used pig intestinal epithelial cell lines: IPEC-J2 and IPI-2I. *Vet Immunol Immunopathol* **131**, 278-84.

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. and Zamore, P. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **123**, 607-20.

Matthijnsens, J., Bilcke, J., Ciarlet, M., Martella, V., Bányai, K., Rahman, M., Zeller, M., Beutels, P., Van Damme, P. and Van Ranst, M.

(2009). Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol* **4**, 1303-16.

McMahon, H. and Gallop, J. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **438**, 590-6.

Mercer, J., Schelhaas, M. and Helenius, A. (2010). Virus Entry by Endocytosis. *Annu Rev Biochem*.

Morrow, I., Rea, S., Martin, S., Prior, I., Prohaska, R., Hancock, J., James, D. and Parton, R. (2002). Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *J Biol Chem* **277**, 48834-41.

Mossel, E. C. and Ramig, R. F. (2002). Rotavirus genome segment 7 (NSP3) is a determinant of extraintestinal spread in the neonatal mouse. *J Virol* **76**, 6502-9.

Mossel, E. C. and Ramig, R. F. (2003). A lymphatic mechanism of rotavirus extraintestinal spread in the neonatal mouse. *J Virol* **77**, 12352-6.

Musalem, C. and Espejo, R. T. (1985). Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. *J Gen Virol* **66 (Pt 12)**, 2715-24.

Méndez, E., López, S., Cuadras, M. A., Romero, P. and Arias, C. F. (1999). Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology* **263**, 450-9.

Naslavsky, N., Weigert, R. and Donaldson, J. G. (2004). Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Mol Biol Cell* **15**, 3542-52.

Nava, P., López, S., Arias, C., Islas, S. and González-Mariscal, L. (2004). The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Sci* **117**, 5509-19.

Nishimura, S., Ushijima, H., Shiraishi, H., Kanazawa, C., Abe, T., Kaneko, K. and Fukuyama, Y. (1993). Detection of rotavirus in cerebrospinal fluid and blood of patients with convulsions and gastroenteritis by means of the reverse transcription polymerase chain reaction. *Brain Dev* **15**, 457-9.

Ohkuma, S. and Poole, B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3327-31.

Pando, V., Isa, P., Arias, C. F. and López, S. (2002). Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* **295**, 190-200.

Parthasarathy, G. and Mansfield, L. S. (2009). Recombinant interleukin-4 enhances *Campylobacter jejuni* invasion of intestinal pig epithelial cells (IPEC-1). *Microb Pathog* **47**, 38-46.

Parton, R. and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 185-94.

Payne, C. K., Jones, S. A., Chen, C. and Zhuang, X. (2007). Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. *Traffic* **8**, 389-401.

Pelkmans, L. and Zerial, M. (2005). Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* **436**, 128-33.

Prydz, K., Hansen, S. H., Sandvig, K. and van Deurs, B. (1992). Effects of brefeldin A on endocytosis, transcytosis and transport to the Golgi complex in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* **119**, 259-72.

Radoshitzky, S. R., Abraham, J., Spiropoulou, C. F., Kuhn, J. H.,

Nguyen, D., Li, W., Nagel, J., Schmidt, P. J., Nunberg, J. H., Andrews, N. C. et al. (2007). Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* **446**, 92-6.

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

Rasschaert, K., Devriendt, B., Favoreel, H., Goddeeris, B. M. and Cox, E. (2010). Clathrin-mediated endocytosis and transcytosis of enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 fimbriae in porcine intestinal epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* **137**, 243-50.

Realpe, M., Espinosa, R., López, S. and Arias, C. (2010). Rotaviruses require basolateral molecules for efficient infection of polarized MDCKII cells. *Virus Res* **147**, 231-41.

Rhoads, J. M., Argenzio, R. A., Chen, W., Rippe, R. A., Westwick, J. K., Cox, A. D., Berschneider, H. M. and Brenner, D. A. (1997). L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. *Am J Physiol* **272**, G943-53.

Rhoads, J. M., Chen, W., Chu, P., Berschneider, H. M., Argenzio, R. A. and Paradiso, A. M. (1994). L-glutamine and L-asparagine stimulate Na⁺ -H⁺ exchange in porcine jejunal enterocytes. *Am J Physiol* **266**, G828-38.

Rodal, S. K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B. and Sandvig, K. (1999). Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* **10**, 961-74.

Roselli, M., Britti, M. S., Le Huërou-Luron, I., Marfaing, H., Zhu, W. Y. and Mengheri, E. (2007). Effect of different plant extracts and natural substances (PENS) against membrane damage induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 in pig intestinal cells. *Toxicol In Vitro* **21**, 224-9.

Rothberg, K., Heuser, J., Donzell, W., Ying, Y., Glenney, J. and Anderson, R. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**, 673-82.

Ruiz, M. C., Charpilienne, A., Liprandi, F., Gajardo, R., Michelangeli, F. and Cohen, J. (1996). The concentration of Ca²⁺ that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *J Virol* **70**, 4877-83.

Ryckman, B., Chase, M. and Johnson, D. (2008). HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14118-23.

Sandvig, K. and van Deurs, B. (2005). Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther* **12**, 865-72.

Schierack, P., Nordhoff, M., Pollmann, M., Weyrauch, K. D., Amasheh, S., Lodemann, U., Jores, J., Tachu, B., Kleta, S., Blikslager, A. et al. (2006). Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol* **125**, 293-305.

Schlie, K., Maisa, A., Freiberg, F., Groseth, A., Strecker, T. and Garten, W. (2010). Viral protein determinants of Lassa virus entry and release from polarized epithelial cells. *J Virol* **84**, 3178-88.

Schmid, E., Ford, M., Burtey, A., Praefcke, G., Peak-Chew, S., Mills, I., Benmerah, A. and McMahon, H. (2006). Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol* **4**, e262.

Schmid, E. and McMahon, H. (2007). Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature* **448**, 883-8.

Schnatwinkel, C., Christoforidis, S., Lindsay, M. R., Uttenweiler-Joseph, S., Wilm, M., Parton, R. G. and Zerial, M. (2004). The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms. *PLoS Biol* **2**, E261.

Schnitzer, J., Oh, P., Pinney, E. and Allard, J. (1994). Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* **127**, 1217-32.

Schoenenberger, C., Zuk, A., Zinkl, G., Kendall, D. and Matlin, K. (1994). Integrin expression and localization in normal MDCK cells and transformed MDCK cells lacking apical polarity. *J Cell Sci* **107 (Pt 2)**, 527-41.

Shogomori, H. and Futerman, A. (2001). Cholera toxin is found in detergent-insoluble rafts/domains at the cell surface of hippocampal neurons but is internalized via a raft-independent mechanism. *J Biol Chem* **276**, 9182-8.

Sieczkarski, S. and Whittaker, G. (2002). Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol* **83**, 1535-45.

Simmons, G., Gosalia, D. N., Rennekamp, A. J., Reeves, J. D., Diamond, S. L. and Bates, P. (2005). Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11876-81.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-72.

Skjolaas, K. A., Burkey, T. E., Dritz, S. S. and Minton, J. E. (2007). Effects of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, or serovar Choleraesuis, *Lactobacillus reuteri* and *Bacillus licheniformis* on chemokine and cytokine expression in the swine jejunal epithelial cell line, IPEC-J2. *Vet Immunol Immunopathol* **115**, 299-308.

Smith, J. L., Campos, S. K. and Ozbun, M. A. (2007). Human papillomavirus type 31 uses a caveolin 1- and dynamin 2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes. *J Virol* **81**, 9922-31.

Snyers, L., Zwickl, H. and Blaas, D. (2003). Human rhinovirus type 2 is internalized by clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **77**, 5360-9.

Stan, R. (2002). Structure and function of endothelial caveolae. *Microsc Res Tech* **57**, 350-64.

Stegmann, T., Booy, F. P. and Wilschut, J. (1987). Effects of low pH on influenza virus. Activation and inactivation of the membrane fusion capacity of the hemagglutinin. *J Biol Chem* **262**, 17744-9.

Su, C., Wu, Y., Shen, H., Wang, D., Chen, Y., Wu, D., He, L. and Yang, Z. (1986). An outbreak of epidemic diarrhoea in adults caused by a new rotavirus in Anhui Province of China in the summer of 1983. *J Med Virol* **19**, 167-73.

Subtil, A., Gaidarov, I., Kobylarz, K., Lampson, M. A., Keen, J. H. and McGraw, T. E. (1999). Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6775-80.

Suzuki, H., Konno, T., Kitaoka, S., Sato, T., Ebina, T. and Ishida, N. (1984). Further observations on the morphogenesis of human rotavirus in MA 104 cells. *Arch Virol* **79**, 147-59.

- Svensson, L., Finlay, B. B., Bass, D., von Bonsdorff, C. H. and Greenberg, H. B.** (1991). Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Virol* **65**, 4190-7.
- Sánchez-San Martín, C., López, T., Arias, C. and López, S.** (2004). Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol* **78**, 2310-8.
- Taatjes, D. J. and Roth, J.** (1988). Alteration in sialyltransferase and sialic acid expression accompanies cell differentiation in rat intestine. *Eur J Cell Biol* **46**, 289-98.
- Tafazoli, F., Zeng, C. Q., Estes, M. K., Magnusson, K. E. and Svensson, L.** (2001). NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. *J Virol* **75**, 1540-6.
- Taylor, M. J., Perrais, D. and Merrifield, C. J.** (2011). A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol* **9**, e1000604.
- ter Haar, E., Musacchio, A., Harrison, S. and Kirchhausen, T.** (1998). Atomic structure of clathrin: a beta propeller terminal domain joins an alpha zigzag linker. *Cell* **95**, 563-73.
- Townsley, A. C., Weisberg, A. S., Wagenaar, T. R. and Moss, B.** (2006). Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *J Virol* **80**, 8899-908.
- Ulloa, F. and Real, F. X.** (2001). Differential distribution of sialic acid in alpha2,3 and alpha2,6 linkages in the apical membrane of cultured epithelial cells and tissues. *J Histochem Cytochem* **49**, 501-10.
- Vainio, S., Heino, S., Mansson, J., Fredman, P., Kuismanen, E., Vaarala, O. and Ikonen, E.** (2002). Dynamic association of human insulin receptor with lipid rafts in cells lacking caveolae. *EMBO Rep* **3**, 95-100.
- Verkade, P., Harder, T., Lafont, F. and Simons, K.** (2000). Induction of caveolae in the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* **148**, 727-39.
- Vogel, U., Sandvig, K. and van Deurs, B.** (1998). Expression of caveolin-1 and polarized formation of invaginated caveolae in Caco-2 and MDCK II cells. *J Cell Sci* **111** (Pt 6), 825-32.
- Wan, J., Taub, M. E., Shah, D. and Shen, W. C.** (1992). Brefeldin A enhances receptor-mediated transcytosis of transferrin in filter-grown Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* **267**, 13446-50.
- Wang, H., Roberson, R., Du, J., Eshun, J. K., Berschneider, H. M. and Black, D. D.** (1999). Regulation of apolipoprotein secretion by biliary lipids in newborn swine intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* **276**, G353-62.
- Wang, H., Yang, P., Liu, K., Guo, F., Zhang, Y., Zhang, G. and Jiang, C.** (2008). SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell Res* **18**, 290-301.
- Weber, T., Paesold, G., Galli, C., Mischler, R., Semenza, G. and Brunner, J.** (1994). Evidence for H(+)-induced insertion of influenza hemagglutinin HA2 N-terminal segment into viral membrane. *J Biol Chem* **269**, 18353-8.
- Whitbeck, J., Foo, C., Ponce de Leon, M., Eisenberg, R. and Cohen, G.** (2009). Vaccinia virus exhibits cell-type-dependent entry characteristics. *Virology* **385**, 383-91.

Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M. and Tashiro, Y. (1991). Bafilomycin A₁, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem* **266**, 17707-12.

Young, A. (2007). Structural insights into the clathrin coat. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 448-58.