



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de la función del complejo proteico COPI en el ciclo de replicación de rotavirus

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

IBQ. José Luis Martínez Guevara

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Carlos F. Arias Ortiz
Instituto de Biotecnología (UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Susana Castro Obregón
Instituto de Fisiología Celular (UNAM)

Dr. Ramón González García Conde
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MÉXICO, D. F. Abril, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Carlos F. Arias Ortiz, en el laboratorio de los Dres. Carlos F. Arias y Susana López (Laboratorio 5, edificio “Sur”). Durante la realización de este estudio se contó con una beca otorgada por el CONACYT. El proyecto fue desarrollado con el apoyo económico del donativo de DGAPA-UNAM IG-200114.

Agradecimientos

Estos dos últimos años he tenido la enorme suerte y satisfacción de conocer y de trabajar con personas que me han ayudado —de una forma u otra— en la consecución de un esfuerzo de investigación que se reúne en el presente documento de tesis, debido a lo cual les estoy profundamente agradecido.

Les doy las gracias a mis padres, José Luis y María Guadalupe, pues les debo todo lo que hasta ahora he logrado, por su apoyo incondicional y respeto; espero darles más y mejores satisfacciones que esta. A mis hermanas, Carolina y Marcela por su respaldo y comprensión, quienes a lo largo de toda mi vida han creído incondicionalmente en mí en todo momento sin dudar de mis habilidades.

De este modo también le agradezco a María del Carmen Lope el amor y apoyo recibido a lo largo de estos últimos años, mostrándome que no estaba solo a pesar de la larga distancia.

Por otro lado me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi agradecimiento al Dr. Carlos F. Arias por su asesoría y orientación durante la realización de este proyecto, a los Dres. Susana Castro y Ramón González por sus comentarios, sugerencias y observaciones durante este trabajo.

De igual forma, le agradezco a los Dres. Susana López, Tomas López y Pavel Isa por sus comentarios críticos durante los seminarios y el trabajo de laboratorio así como por su generosidad al compartir sus conocimientos de manera desinteresada para resolver las dudas que surgieron a lo largo del trayecto de esta tesis.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a la Dra. Daniela Silva por su invaluable asesoría y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Finalmente agradezco también a mis amigos y miembros del grupo Arias/López, por su convivencia y los conocimientos compartidos.

A todos ustedes muchas gracias

Índice general

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE GENERAL	3
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
I. INTRODUCCIÓN	10
1.1. ROTAVIRUS	10
1.1.1. Estructura y morfología del virión	10
1.1.2. Proteínas de superficie de rotavirus	11
1.1.2.1. VP7	11
1.1.2.2. VP4	13
1.1.3. Ciclo general de la replicación de rotavirus	13
1.2. TRANSPORTE VESICULAR	17
1.2.1. Complejo de proteínas COPI (Coatomer protein I)	17
1.2.1.1. Funciones de COPI	19
II. ANTECEDENTES	21
III. HIPÓTESIS	23
IV. OBJETIVOS	23
4.1. OBJETIVO GENERAL	23
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
V. METODOLOGÍA	24
5.1. LÍNEA CELULAR Y CEPAS VIRALES	24
5.2. ANTICUERPOS Y REACTIVOS	24
5.3. ENSAYOS DE INFECTIVIDAD DE ROTAVIRUS	24
5.4. DETERMINACIÓN DE PROGENIE VIRAL INFECCIOSA DE ROTAVIRUS	25
5.5. VIABILIDAD CELULAR	25
5.6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	26
5.7. ENRIQUECIMIENTO DE PARTÍCULAS VIRALES	26

5.8.	PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES POR CENTRIFUGACIÓN ISOPÍCNICA.	27
5.9.	ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA	27
VI.	RESULTADOS	29
6.1.	LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE COPI CON BREFELDINA A DISMINUYE LA INFECTIVIDAD DE ROTAVIRUS.	29
6.2.	EL TRATAMIENTO CON BFA O GCA DISMINUYE DE MANERA SIGNIFICATIVA LA PRODUCCIÓN DE PROGENIE VIRAL INFECCIOSA DE ROTAVIRUS.	31
6.3.	LA REDUCCIÓN DE LA PROGENIE INFECCIOSA DE ROTAVIRUS PROVOCADA POR BFA Y GCA ESTÁ RELACIONADA CON EL ENSAMBLADO DE PARTÍCULAS VIRALES.	33
6.4.	EL TRATAMIENTO CON BFA O GCA ALTERA LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE VP7.	35
6.5.	EL TRATAMIENTO CON BFA O GCA BLOQUEA LA PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS DE TLPS.	37
6.6.	LA CEPA DE ROTAVIRUS SA11CL28, QUE CONTIENE UNA MUTACIÓN EN EL SITIO DE GLICOSILACIÓN (ASPARAGINA 69) EN VP7, TAMBIÉN ES SENSIBLE A LOS TRATAMIENTOS CON BFA O GCA.	39
6.7.	EL TRATAMIENTO CON BFA O GCA BLOQUEA LA TRIMERIZACIÓN DE VP7 Y MODIFICA SU DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR.	41
VII.	DISCUSIÓN	45
VIII.	CONCLUSIONES	49
IX.	PERSPECTIVAS	50
X.	REFERENCIAS	51

Índice de figuras

Figura 1.- Genoma y estructura de las partículas de rotavirus	11
Figura 2.- Estructura de VP7.....	12
Figura 3.- Estructura de VP4.....	13
Figura 4.- Ciclo de replicación de rotavirus	15
Figura 5.- Formación de vesículas recubiertas de COPI	18
Figura 6.- La infectividad de rotavirus es reducida por BFA pero no por GCA	30
Figura 7.- El tratamiento con BFA o GCA reduce de progenie viral infecciosa de rotavirus	32
Figura 8.- La reducción de la progenie viral de rotavirus provocada por BFA y GCA disminuye cuando los inhibidores son adicionados después de las 4 hpi.....	33
Figura 9.-La aparición de nuevas partículas de rotavirus comienza a partir de las 4 hpi... ..	35
Figura 10.- El tratamiento con BFA y GCA altera la movilidad electroforética de VP7.....	36
Figura 11.- El tratamiento con BFA o GCA bloquea la producción de partículas de TLPs.. ..	38
Figura 12.- El tratamiento con BFA o GCA reduce la progenie viral infecciosa de la cepa SA11 de rotavirus así como la progenie de la clona 28 de SA11	40
Figura 13.- El tratamiento con BFA o GCA altera la movilidad de la proteína VP7 no glicosilada de SA11CL28	41
Figura 14.- Los tratamientos con BFA o GCA impiden la formación de los trímeros de VP7	42
Figura 15.- El tratamiento con BFA o GCA modifican la distribución intracelular de VP7... ..	44

Índice de Tablas

Tabla 1.- El tratamiento con BFA o GCA no altera la viabilidad celular	31
--	----

Abreviaturas

AP-1	Proteína adaptadora 1 (siglas de "Adaptor protein 1")
ARF1	Factor de ribosilación de ADP 1 (siglas de "ADP ribosilation factor 1")
ARF1GAP	Proteína activadora de la GTPasa ARF1 (siglas de "ARF1 GTPasa activation Protein")
BFA	Brefeldina A
BIG	GEF inhibido por Brefeldina A (siglas de "Brefeldin A-inhibited GEF")
COPI	Complejo proteico de cubierta I (siglas de "Coatomer Protein I")
COPII	Complejo proteico de cubierta II (siglas de "Coatomer Protein II")
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DLPs	Partículas de doble capa (siglas de "Double Layered particles")
DMSO	Dimetilsulfoxido
dsRNA	RNA de cadena doble (siglas de "Double strand RNA")
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético (siglas de "ethylene glycol tetraacetic acid")
ERGIC	Compartimiento intermedio entre el RE y el Golgi (siglas de "ER-Golgi intermedial compartment")
GBF1	Factor de resistencia a Brefeldina A específico del Golgi 1 (siglas de "Golgi-specific Brefeldin A-resistance factor 1")
GCA	Golgicida A
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Factor de intercambio de guanina (siglas de "Guanine nucleotide exchange factors")
GGA	Adaptina gama asociada al Golgi (siglas de "Golgi associate gama adaptin")
GTP	Guanosín trifosfato
Hpi	Horas pos-infección
Hsc	Proteína de choque térmico (siglas de "Heat shock cognate protein")
LD	Gotas Lipídicas (siglas de "Lipid Droplets")
LDH	Lactato deshidrogenasa
MHV	Virus de hepatitis de ratón (siglas de "Murine Hepatitis C virus")
MOI	Multiplicidad de infección (siglas de "Multiplicity of infection")
PAGE	Geles de poliacrilamida (siglas de "Polyacrilamyde gels")
RE	Retículo endoplasmico
RNA	Ácido ribonucleico (siglas de "Ribonucleic acid")

Rpm	Revoluciones por minuto
RRV	Rotavirus de simio cepa "Rhesus"
SA11	Rotavirus de simio cepa "SA11"
SA11CL28	Rotavirus de simio "SA11 clona 28"
SDS	Docecilsulfato de sodio
siRNA	RNA pequeño de interferencia (siglas de "Small interfering RNA")
SLPs	Partículas de una sola capa (siglas de "Single layered particles")
SV40	Virus de simio "Simian virus 40"
TLPs	Partículas de triple capa (siglas de "Triple layered particles")
UFF	Unidades formadoras de focos
VHC	Virus de hepatitis C
VSV	Virus de la estomatitis vesicular (siglas de "Vesicular stomatitis virus")

Resumen

Los rotavirus, son partículas icosaédricas formadas por tres capas de proteínas concéntricas que rodean al genoma viral constituido por once segmentos de RNA de doble cadena, que no están envueltas en una bicapa de lípidos. La capa proteica más interna está compuesta por la proteína VP2, que rodea a las proteínas VP1 y VP3, asociadas al genoma del virus. La capa intermedia está formada por VP6, la cual al ensamblarse genera partículas de doble capa o DLPs (del inglés, Double-Layered Particles). Finalmente, la capa más externa de proteínas se encuentra compuesta por la glicoproteína VP7, a partir de la cual se proyectan espículas formadas por la proteína VP4 para formar las partículas infecciosas de triple capa o TLPs (del inglés, Triple-Layered Particles) (Estes *et al.* 2013; Trask *et al.* 2012). En años recientes se ha avanzado en el conocimiento más preciso de los mecanismos moleculares empleados por estos virus para infectar exitosamente a la célula hospedera. Recientemente se reportó la identificación de más de 500 proteínas celulares relacionadas con la replicación de rotavirus (Silva-Ayala *et al.* 2013). Entre la amplia variedad de factores celulares identificados en este ensayo, se encontró que proteínas involucradas en el sistema de transporte vesicular mediado por COPI (Coatomer Protein I) pudieran estar relacionadas estrechamente con la replicación de rotavirus, ya que su silenciamiento reduce la infectividad del virus (Silva-Ayala *et al.* 2013). Con el fin de conocer de manera más precisa la función de este complejo en la replicación de rotavirus, en este trabajo se evaluó la participación de COPI en el ciclo de replicación viral mediante el uso de inhibidores como Brefeldina A (BFA) y Golgicida A (GCA), capaces de bloquear el reclutamiento de COPI hacia las membranas del Golgi, a partir de las cuales se generan vesículas que posteriormente son transportadas a diferentes sitios de la célula (Mossessova *et al.* 2003; Sáenz *et al.* 2009). Al evaluar los efectos de estos inhibidores en la replicación de rotavirus, se encontró que BFA y GCA reducen alrededor de 100 veces la producción de la progenie viral infecciosa. Particularmente, se encontró que la reducción de la progenie viral provocada por BFA y GCA comienza a perderse cuando estos inhibidores son adicionados después de la aparición de nuevas partículas virales, sugiriendo que la función de COPI está relacionada con la morfogénesis de rotavirus. Al analizar el efecto de BFA y GCA sobre el ensamblado de las partículas virales, se encontró que estos inhibidores bloquean el ensamble de la capa externa del virus permitiendo solamente la producción de DLPs. Asimismo, estos inhibidores también

afectaron la movilidad electroforética de VP7, se ha sugerido que el tratamiento con BFA puede estar relacionado con la alteración del procesamiento de la cadena de oligosacáridos unida a VP7, que en última instancia pudiera afectar la morfogénesis de rotavirus (Mirazimi *et al.* 1996). Sin embargo, BFA y GCA también redujeron significativamente la progenie infecciosa de la clona 28 de SA11, la cual contiene una proteína mutante de VP7 que no puede ser glicosilada (Estes *et al.* 1982). De manera interesante, la movilidad de esta proteína mutante también se afecta por el tratamiento con los inhibidores, por lo que el efecto de BFA y GCA parece no estar relacionado a la alteración del procesamiento de los oligosacáridos unidos a VP7. Por otra parte, se encontró que el bloqueo en la adquisición de la capa externa del virus parece estar relacionado con la inhibición de la formación de los trímeros de VP7, los cuales son necesarios para que VP7 pueda incorporarse a la partícula viral (Aoki *et al.* 2009), ya que durante los tratamientos con BFA y GCA no es posible detectar la forma trimérica de esta proteína. Además de esto, también se encontró que los tratamientos con BFA y GCA alteran la distribución intracelular de los monómeros de VP7. Estos resultados, en conjunto, sugieren que la disrupción del complejo COPI mediante inhibidores de la actividad del factor GBF1, provoca una disminución de la progenie viral infecciosa a través de bloquear el ensamblado de las proteínas de la capa externa del virus sobre las DLPs para formar las partículas de triple capa infecciosas, lo cual parece deberse a la inhibición de la trimerización de VP7.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Rotavirus

1.1.1. Estructura y morfología del virión

Los rotavirus son virus no envueltos, que tienen aproximadamente 100 nm de diámetro y están compuestos por tres capas concéntricas de proteínas que engloban al genoma viral, el cual consta de once segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA), con un rango de tamaño entre 660 y 3300 pares de bases que codifican para doce proteínas: seis estructurales (VP1 a VP4, VP6 y VP7) y seis no estructurales (NSP1 a NSP6) (Figura 1a) (Estes *et al.* 2013).

La capa más interna del virión está compuesta de 120 copias de la proteína VP2 (120 kDa) que se encuentra en forma de dímeros. Asociadas a la parte interna de esta capa están las proteínas VP1 (125 kDa) con actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA y VP3 (88 kDa) con actividades guanilil-transferasa y metilasa. Al interior de la capa de VP2 se encuentra el genoma del virus. En su conjunto estas proteínas y el genoma forman el núcleo viral, también conocido como partícula de una capa o SLP (del inglés "Single Layered Particle") (Figura 1b) (Trask *et al.* 2012).

Rodeando a la SLP se localiza una capa intermedia más gruesa formada por 260 trímeros de la proteína VP6 (monómeros de 45 kDa), creando partículas de doble capa o DLPs (Double Layered Particles). El acoplamiento de la proteína VP6 es de gran importancia para la estructura del virión, ya que además de conferir estabilidad al frágil núcleo de la partícula viral, también sirve como un adaptador para las proteínas de la cápside exterior del virus (Trask *et al.* 2012) (Figura 1b).

Finalmente, sobre la capa intermedia se acoplan 260 trímeros de la glicoproteína VP7 (monómeros de 37 kDa) creando una estructura continua, en donde se proyectan hacia el exterior 60 espículas de 120 Å de longitud constituidas por trímeros de la proteína VP4 (88 kDa) para formar las partículas infecciosas de triple capa o TLPs (Triple Layered Particles) (Figura 1b) (Trask *et al.* 2012).

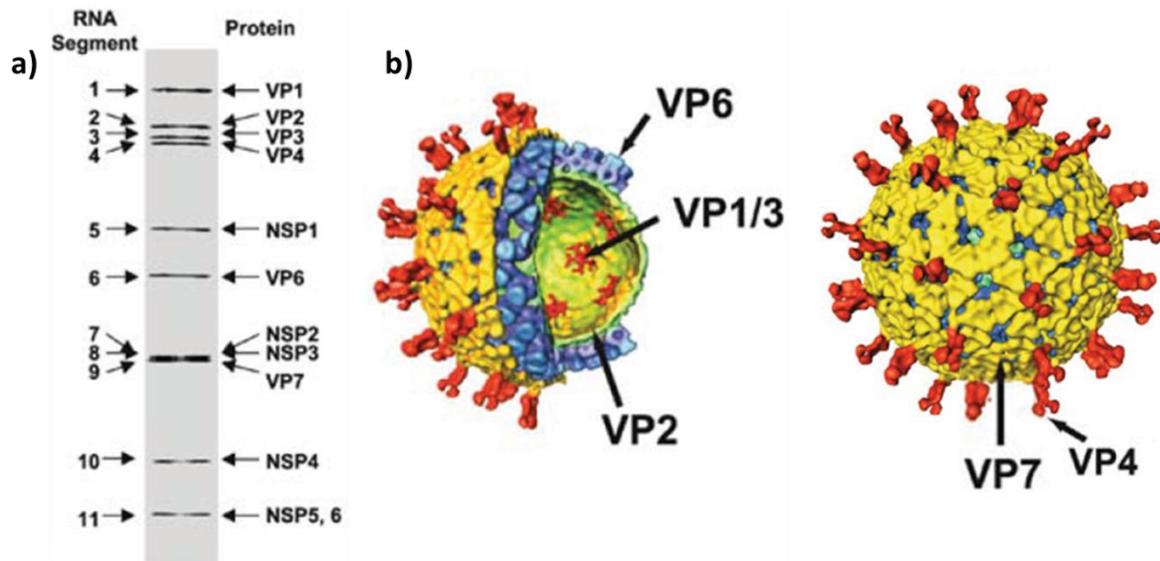


Figura 1.- Genoma y estructura de las partículas de rotavirus. **a)** Segmentos de dsRNA que comprenden el genoma de rotavirus, los cuales se encuentran numerados de acuerdo a su migración en el gel. A la derecha se indican las proteínas codificadas por cada segmento. **b)** Representación de una partícula madura de rotavirus, en donde se observa la capa interna o núcleo formado por el complejo de VP1-VP3 recubierto por la proteína VP2 (verde), así como la capa intermedia formada por la proteína VP6 (azul) y las proteínas de la capa externa VP7 (amarillo) y VP4 (rojo) (Tomado de Pesavento *et al.* 2006).

1.1.2. Proteínas de superficie de rotavirus

1.1.2.1. VP7

Como se mencionó anteriormente, VP7 forma la capa más externa del virus. Esta es una glicoproteína que consta de 326 aminoácidos y tiene una cadena de azúcares de alto contenido de manosas anclada en la asparagina 69. Su traducción inicia a partir de un codón de inicio con una secuencia consenso débil, no obstante esta proteína también contiene un codón de inicio secundario con una secuencia consenso más fuerte, el cual está ubicado 30 codones río abajo. Cada uno de los codones de inicio precede dos regiones hidrofóbicas en el extremo amino terminal, que funcionan como péptido señal para que esta proteína pueda anclarse en la membrana del retículo endoplásmico (RE). Durante su síntesis, de manera co-traducciona, la proteína se corta en la glutamina 51 por la señalasa del RE (eukaryote signal peptidase), retirando de esta forma el péptido señal (Estes *et al.* 2013; Stirzaker *et al.* 1987).

Aunque no se ha determinado la secuencia de retención necesaria para que VP7 se mantenga en el RE, se ha encontrado que la presencia de los residuos Ile-9, Thr-10 y Gly-11 en el extremo N-terminal de esta proteína son de especial importancia para su retención en el retículo endoplasmico (Maass y Atkinson, 1994).

La estructura terciaria de VP7, está formada por un dominio de plegamiento de Rossman (dominio I) y por un dominio de barril beta (dominio II). Esta proteína contiene 4 puentes disulfuro, uno dentro del dominio I y tres en el dominio II, los cuales son importantes para el correcto plegamiento de la proteína y el ensamblado de la capa externa (Figura 2a). Para incorporarse al virión y formar la capa de externa del virus, la proteína VP7 requiere estar en forma trimérica, lo cual depende de la presencia de iones Ca^{2+} en el medio, ya que dos iones de este elemento participan en la unión de los monómeros de VP7, para formar el trímero (Figura 2b). La participación de iones Ca^{2+} libres para la formación de los trímeros de VP7 es de especial importancia para la estabilización de la capa externa de las partículas virales, ya que en concentraciones menores de 100 nm de calcio, la capa externa se desprende de las TLPs para generar DLPs (Estes *et al.* 2013; Aoki *et al.* 2009; Trask *et al.* 2012).

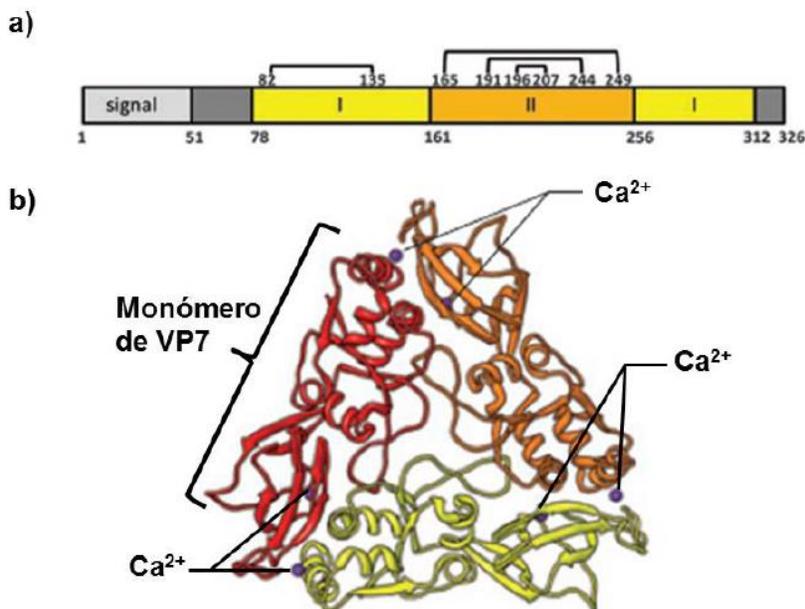


Figura 2.- Estructura de VP7. **a)** Diagrama de la estructura primaria de VP7, donde se puede observar el péptido señal (residuos 1 a 50, gris claro, signal) así como los dominios I (amarillo) y II (naranja) de esta proteína junto con los extremos N- y C-terminal (gris oscuro). De igual forma se muestra el patrón de los puentes disulfuro de esta proteína con los números correspondientes a los residuos de cisteína. **b)** Diagrama de un trímero de VP7, en el cual se puede observar la ubicación de dos iones Ca^{2+} (morado) entre la unión de los monómeros de VP7 (Tomado y modificado de Trask *et al.* 2012; Aoki *et al.* 2009).

1.1.2.2. VP4

Las espículas del virus que se proyectan a partir de la capa de VP7 están formadas por trímeros de la proteína VP4, la cual está compuesta por 776 aminoácidos y es una proteína citosólica que se localiza entre el viroplasma y la membrana del RE (ver abajo y González *et al.* 2000). Las espículas de VP4 poseen una estructura distintiva formada por dos dominios (un cuerpo central y un dominio globular) que al ser tratados con enzimas proteolíticas como tripsina generan los fragmentos VP8 (domino globular) y VP5 (cuerpo central). El corte proteolítico es de gran importancia para el proceso de interacción del virus con el receptor celular y el ingreso del virus a la célula (Figura 3) (Estes *et al.* 2013; Trask *et al.* 2012). Sin embargo a diferencia de VP7, la proteína VP4 no se requiere para el ensamble de la capa externa (Déctor *et al.* 2002), ocurrido en el último paso de la morfogénesis del virus.

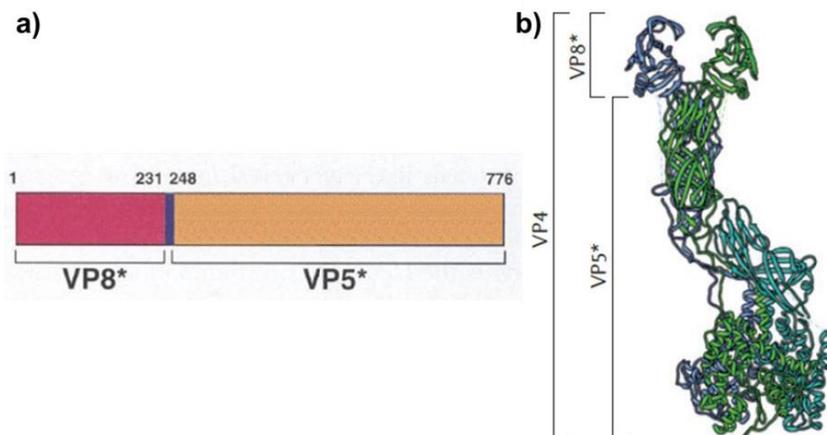


Figura 3.- Estructura de VP4. **a)** Diagrama de la estructura primaria de VP4, donde se observan la posición de los diferentes dominios que componen las subunidades VP8 (magenta) y VP5 (naranja). Los números superiores representan las posiciones de aminoácidos que abarca cada dominio. **b)** Estructura terciaria de VP4, donde se muestra la distribución espacial de los diferentes dominios de VP4, en donde el cuerpo central formado por VP5 se ubica en la parte inferior de la espícula donde se realiza el anclaje de la proteína a la capa de VP7 y el dominio globular de VP8 se localiza hacia la parte superior en donde puede interaccionar con los diferentes receptores celulares (Tomado y modificado de Estes *et al.* 2013; Trask *et al.* 2012).

1.1.3. Ciclo general de la replicación de rotavirus

Aunque los rotavirus poseen un tropismo natural por enterocitos diferenciados del intestino delgado, estos virus también son capaces de infectar otro tipo de células en humanos y animales. Muchos de los detalles del ciclo de replicación de los rotavirus han sido descubiertos debido a estudios moleculares, bioquímicos y morfológicos (microscopía electrónica) realizados en cultivos derivados de células de epitelio renal de mono, en las cuales el virus se replica eficientemente (Estes *et al.* 2013).

Los rotavirus se replican exclusivamente en el citoplasma mediante un proceso altamente complejo (Figura 4) que comienza con la unión o adherencia del virus a la superficie de la célula hospedera mediante diferentes receptores celulares dependiendo de la cepa, como el ácido sialico, algunas integrinas y la proteína Hsc70 (del inglés, heat shock cognate protein 70) (Figura 4, paso 1). Hsc70 parece ser de especial importancia para todos las cepas de rotavirus que han sido estudiadas (Estes *et al.* 2013).

Una vez unido a la superficie celular, la entrada del rotavirus a la célula se puede realizar a través de distintas vías endocíticas (dependientes o independientes de clatrina) de acuerdo a la cepa viral (Gutiérrez *et al.* 2010). Independientemente de la vía de entrada, los virus internalizados son transportados hasta los endosomas tempranos. Algunas cepas, como el rotavirus de simio rhesus (RRV) parecen perder la capa proteica más externa en estos organelos y liberar al citoplasma partículas de DLPs para comenzar la transcripción de los mRNAs a partir de cada uno de los segmentos del genoma viral. Sin embargo, otras cepas virales como el rotavirus bovino UK, parece llegar hasta endosomas tardíos, a partir de los cuales entra al citoplasma (Díaz-Salinas *et al.* 2014; Trask *et al.* 2012) (Figura 4, pasos 2 y 3).

Posteriormente, los mRNAs dirigen la síntesis de proteínas virales que son reclutadas en estructuras citoplasmáticas electro-densas denominadas viroplasmas (Figura 4, paso 4), en los cuales se localiza la mayoría de las proteínas estructurales del virus (VP1, VP2, VP3 y VP6), así como las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5, que representan los componentes mayoritarios de estas estructuras. Particularmente, NSP2 y NSP5 son capaces de inducir la formación de estructuras parecidas a viroplasmas cuando son co-expresadas en ausencia de las demás proteínas virales (Trask *et al.* 2012; Fabbretti *et al.* 1999).

Los viroplasmas pueden asociarse a las gotas lipídicas (Lipid Droplets, LDs), las cuales se ha reportado que son necesarias para la correcta formación de los viroplasmas, ya que el bloqueo o la interferencia de la formación de estos organelos reduce el número de viroplasmas y la producción de virus infeccioso (Cheung *et al.* 2010).

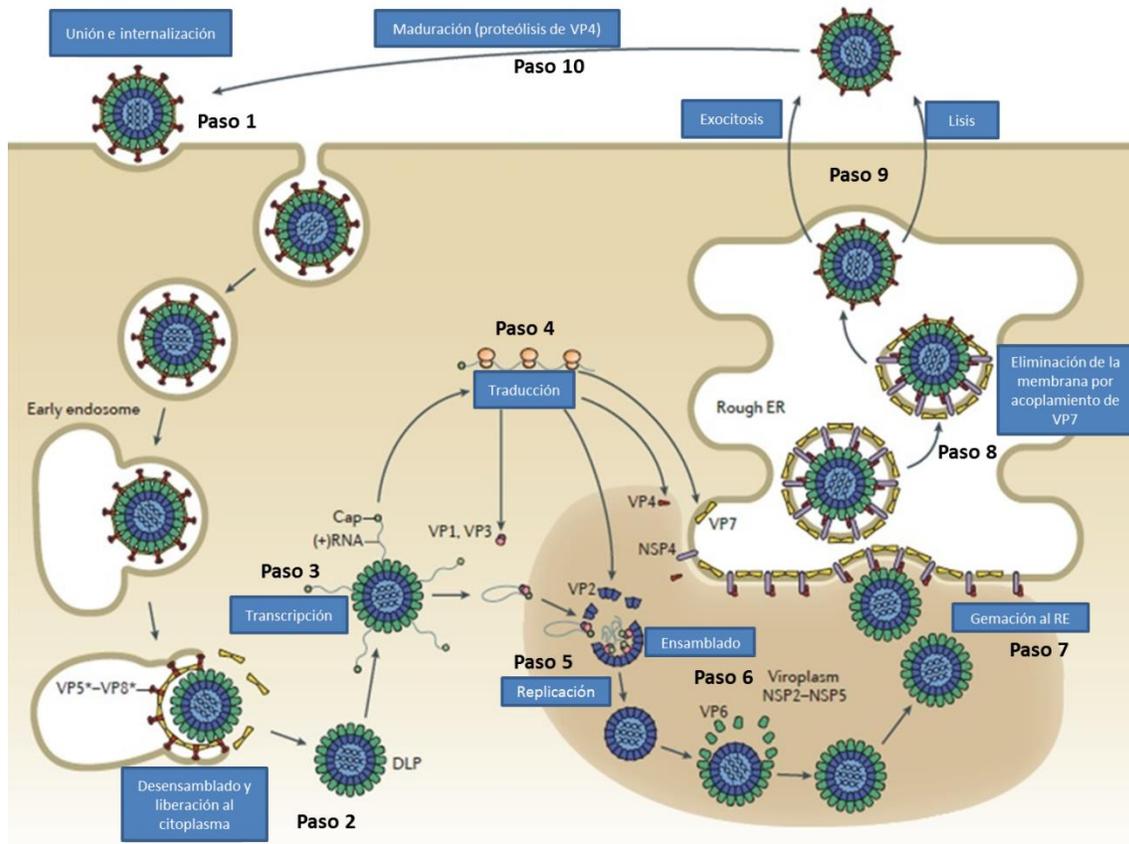


Figura 4.- Ciclo de replicación de rotavirus. El virión de rotavirus se une a la superficie celular a través de receptores celulares en la membrana y es internalizado por medio de distintas vías endocíticas hacia los endosomas, a partir de los cuales es liberado en forma de DLP al citoplasma. Una vez en el citoplasma las DLPs producen los mRNAs encargados de dirigir la síntesis de las proteínas virales, las cuales son reclutadas en los viroplasmos donde se lleva a cabo la replicación del genoma y el ensamblado de nuevas DLPs. Las nuevas DLPs geman hacia el interior del RE, donde adquieren la capa externa de proteínas para convertirse en partículas de TLPs maduras, las cuales son liberadas al medio extracelular mediante exocitosis o lisis celular para iniciar un nuevo ciclo de replicación (Tomado y modificado de Trask *et al.* 2012).

Los viroplasmos representan las fábricas en donde se realizan la replicación y el empaquetado del genoma en nuevas partículas virales. Este tipo de inclusiones no solo recluta las proteínas de la cápside de rotavirus, sino que además en éstos se logra la regulación espacial y temporal de las interacciones entre las proteínas virales, permitiendo que la replicación y empaquetamiento del genoma esté coordinado con el ensamblado de las partículas para permitir la producción correcta de progenie viral infecciosa (Patton *et al.* 2006) (Figura 4, paso 5 y 6). El mecanismo de empaquetamiento selectivo que permite la presencia de cantidades equimolares de los segmentos genómicos en las partículas de rotavirus no se conoce con claridad, pero independientemente del mecanismo utilizado para el ensamblado de las SLPs, se ha propuesto que éstos se unen a la superficie de los viroplasmos, que se encuentra enriquecida con la proteína VP6, en la cual subsecuentemente se convierten en DLPs (Patton *et al.* 2006).

Posteriormente, las nuevas DLPs geman hacia el interior del RE, a través de sitios de la membrana modificados por la presencia de VP7 y por una segunda glicoproteína viral, llamada NSP4, a la cual además pueden asociarse las espículas de la proteína VP4 (Figura 4, paso 7) (Suzuki *et al.* 1993; Maass y Atkinson, 1990; Soler *et al.* 1982).

NSP4 (20 kDa) es una proteína no estructural de 175 amino ácidos, modificada en su extremo amino terminal por dos cadenas ricas en manosa, mediante N-glicosilación en las asparaginas 8 y 18. Al igual que VP7, NSP4 también es una proteína residente del RE, sin embargo, la mayor parte de ésta se encuentra orientada hacia el citosol (Estes *et al.* 2013; Bergmann *et al.* 1989). Se ha descrito que la asociación de NSP4 con la proteína VP6 de las DLPs sirve como receptor para la inducción del proceso de gemación de estas partículas hacia el interior del RE, proceso durante el cual las partículas adquieren una membrana transitoria que contiene a las proteínas NSP4, VP7 y VP4 (Au *et al.* 1989; Chasey, 1977; Poruchynsky y Atkinson, 1991). Posteriormente, conforme la partícula avanza hacia el interior del RE, la bicapa lipídica adquirida durante el proceso de gemación es removida junto con NSP4, permitiendo simultáneamente el ensamble de las proteínas VP7 y VP4, para producir así las partículas maduras finales de triple capa, que son infecciosas (Figura 4, paso 8) (Petrie *et al.* 1981; Suzuki *et al.* 1993).

Aunque el mecanismo de remoción de la capa transitoria de lípidos no se conoce, se ha sugerido que la proteína VP7 puede ser importante para este proceso, ya que en condiciones en que se ha disminuido su síntesis por interferencia del RNA (RNAi), o bien por un tratamiento prolongado con un agente reductor que impida la formación de puentes disulfuro y el plegamiento correcto de VP7, se previene la pérdida de lípidos de las partículas intermediarias, las cuales se acumulan en el lumen del RE (López *et al.* 2005; Svensson *et al.* 1994). Asimismo, la maduración de las partículas de rotavirus es un proceso dependiente de calcio, ya que tratamientos que disminuyen los niveles de calcio en el RE reducen la producción viral y provocan que los virus ensamblados sean casi exclusivamente DLPs (Shahrabadi y Lee, 1986; Shahrabadi *et al.* 1987; Poruchynsky *et al.* 1991). El calcio se requiere durante la morfogénesis de rotavirus ya que es necesario para la formación de los trimeros de VP7, y esta estructura trimérica es indispensable para que la proteína se incorpore a DLPs y forme la capa externa del virus. Se ha sugerido que la interacción entre sí de los trimeros de VP7 durante su ensamblado en la partícula, excluye eventualmente la membrana de lípidos adquirida durante la gemación (Aoki *et al.* 2009; Estes *et al.* 2013).

Finalmente, estas nuevas partículas de TLPs son liberadas al medio extracelular por medio de una ruta exocítica independiente del Golgi o por lisis celular, dependiendo del tipo de célula (Figura 4, paso 9). Una vez liberadas las nuevas partículas, estas requieren del corte proteolítico de VP4 para producir los fragmentos de VP8 y VP5 presentes en las partículas infecciosas finales capaces de comenzar un nuevo ciclo de replicación (Figura 4, paso 10) (Trask *et al.* 2012).

1.2. Transporte vesicular

De manera muy simple, se puede pensar que las células eucariotas son una colección de organelos internos espacialmente distribuidos dentro del citoplasma. La comunicación entre estos compartimientos se encuentra mediada por distintos eventos de tráfico intracelular, algunos de los cuales se realizan por transporte vesicular (Alberts *et al.* 2002). Durante este proceso, los componentes a ser transportados (proteínas, carbohidratos y lípidos) son seleccionados e incluidos en vesículas con diámetro aproximado de 50 a 100 nm, las cuales al ser liberadas de su sitio de origen viajan a través del citoplasma hasta alcanzar su compartimiento de destino, en donde su fusión permite la entrega de su contenido (Popoff *et al.* 2011).

La mayoría de las vesículas de transporte se forman a partir de regiones de membranas cuyas superficies citosólicas se encuentran recubiertas por proteínas distintivas. Estas estructuras son liberadas en forma de vesículas recubiertas de proteínas, las cuales posteriormente pierden su recubrimiento proteico antes de fusionarse con su compartimiento de destino. Existen varios tipos de vesículas que actúan en distintos sitios de la célula, las cuales se distinguen por el tipo de proteínas estructurales que las conforman. Las mejor caracterizadas son aquellas recubiertas de clatrina, de COPI y de COPII (Alberts *et al.* 2002).

1.2.1. Complejo de proteínas COPI (Coatomer protein I)

El complejo de proteínas de COPI está constituido por 7 subunidades diferentes (α , β , β' , δ , ϵ , γ y ζ), las cuales forman vesículas recubiertas capaces de capturar de forma eficiente proteínas de membrana que posean algunos de los motivos dilisina KKXX o KXKXX (donde X es cualquier aminoácido), así como proteínas luminales con la secuencia KDEL (lisina- ácido aspártico- ácido glutámico- leucina) en su extremo C-terminal (Kirchhausen, 2000).

En el evento inicial del transporte mediado por vesículas recubiertas con COPI, la GTPasa ARF1 (del inglés, ADP ribosilation factor 1) es activada al unirse a una molécula de GTP a través de una reacción mediada por el factor de intercambio de guanina (GEF) denominado GBF1 (del inglés, Golgi-specific Brefeldin A-resistance factor 1), provocando la asociación de ARF1 a la membrana (Figura 5, paso 1). Posteriormente, ARF1 promueve la unión de los complejos COPI y el reclutamiento de las proteínas cargo (Figura 5, paso 2), la unión y polimerización del complejo COPI promueve la deformación de la membrana que permite la creación de una vesícula recubierta de COPI, la cual es escindida debido a la misma deformación creada en la membrana (Figura 5, pasos del 3-5).

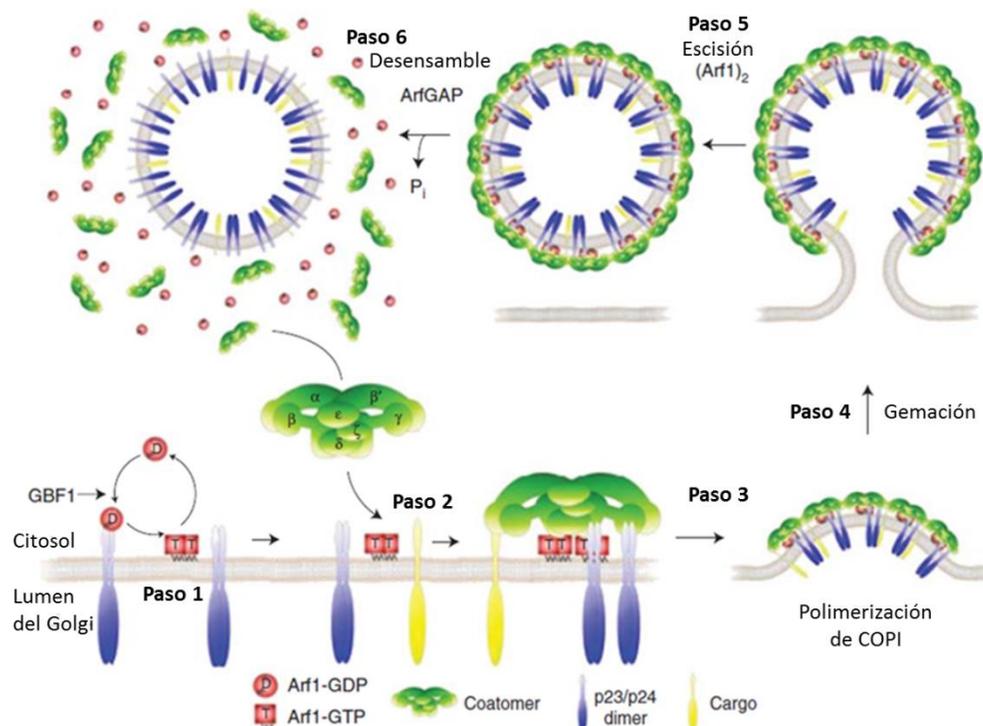


Figura 5.- Formación de vesículas recubiertas de COPI. La formación de las vesículas y el ensamblado del recubrimiento de COPI son activados por el reclutamiento de ARF1-GTP en la membrana, permitiendo la unión de COPI y la incorporación de las proteínas cargo, cuando el recubrimiento de COPI se completa la vesícula formada se libera. La inactivación de ARF1 debido a la actividad de ARF1GAP promueve el desacomplamiento de COPI para producir la vesícula final (tomado y modificado de Kirchhausen, 2000).

Finalmente, la proteína ARF1GAP (del inglés, ARF1 GTPasa activation protein) promueve la actividad GTPasa de ARF1 provocando su inactivación y la pérdida de los complejos COPI para producir la vesícula final encargada del transporte (Figura 5, paso 6) (Kirchhausen, 2000).

1.2.1.1. Funciones de COPI

De acuerdo con estudios de microscopía electrónica, COPI se localiza principalmente en membranas y vesículas que rodean el aparato de Golgi, el RE, así como un compartimiento intermedio entre estos organelos denominado ERGIC (del inglés endoplasmatic reticulum-Golgi intermedial compartment) (Griffiths *et al.* 1995; Duden *et al.* 1991). Por estas observaciones se ha establecido que la principal función de este complejo es el transporte entre las cisternas de Golgi así como el transporte existente entre el RE y el aparato de Golgi.

Aunque la función mejor caracterizada de las vesículas de COPI es el transporte retrogrado (transporte del Golgi al RE) de proteínas y lípidos, todavía existe un gran debate acerca de sus funciones en el transporte anterogrado (transporte del RE al Golgi), puesto que a pesar de que la inhibición de COPI por diferentes métodos altera el tráfico hacia el Golgi, no se ha podido establecer si esto es consecuencia de un efecto directo o es una consecuencia secundaria de la falta del reciclado de componentes del sistema COPII, encargado del transporte anterogrado, o de la maduración del ERGIC (Popoff *et al.* 2011).

Por otro lado, las actividades de COPI encontradas en el transporte intra-Golgi han dado lugar al establecimiento de varios modelos para explicar sus funciones. De acuerdo al modelo vesicular, el aparato de Golgi es estático y gracias a la actividad anterograda de COPI se logra el transporte de nuevas proteínas y lípidos a las cisternas sucesivas. En el modelo de maduración, las cisternas del Golgi son formadas en el cis-Golgi y progresan en el Golgi hasta desensamblarse finalmente en el trans-Golgi; éste requiere el transporte retrogrado de COPI para el mantenimiento de las proteínas residentes del Golgi que permitan la maduración de las cisternas a lo largo de este organelo (Rabouille y Klumperman, 2005; Glick & Luini, 2011).

Asimismo, las observaciones de estos dos modelos han provocado el surgimiento de un tercer modelo combinado en donde COPI media el transporte bidireccional entre dos cisternas adyacentes generando un flujo cruzado de proteínas en el Golgi (Popoff *et al.* 2011; Glick & Luini, 2011).

Además de la distribución de COPI en organelos de la ruta secretoria (RE, ERGIC y Golgi), también se ha identificado la presencia de COPI en membranas endosomales (Whitney *et al.* 1995; Aniento *et al.* 1996), donde puede participar en el reciclado de

cargos a la membrana plasmática o en la maduración de endosomas tempranos (Daro *et al.* 1997; Gu *et al.* 1997), así como en la maduración de fagosomas, autofagosomas y peroxisomas (Botelho *et al.* 2000; Razi *et al.* 2009; Lay *et al.* 2006). Sin embargo, no está claro si para estas funciones COPI actúa directamente como un recubrimiento o estos procesos dependen de forma indirecta de las funciones de las vesículas formadas COPI (Popoff *et al.* 2011).

De igual forma, los organelos denominados gotas lipídicas o Lipid Droplets (LDs), que se forman a partir de la membrana del RE y son liberadas al citoplasma, también requieren de la actividad de COPI para el transporte de enzimas desde el RE a los LDs que permitan su correcta formación y funcionamiento, por lo cual a COPI también se le ha relacionado de esta forma en el control de la homeostasis de los lípidos en la célula (Wilfling *et al.* 2014; Guo *et al.* 2008; Beller *et al.* 2008; Ellong *et al.* 2011).

Las LDs fueron consideradas por décadas como inclusiones pasivas de almacenamiento de lípidos neutros (diacilglicerol, ésteres de colesterol), sin embargo, recientemente, debido a que se ha encontrado que en este tipo de organelos se localizan muchas de las enzimas involucradas en la síntesis de fosfolípidos y triacilgliceroles, así como lipasas y reguladores lipolíticos, se les ha llegado a considerar como organelos dinámicos con un papel esencial en la homeostasis de lípidos. Estos organelos, además de proveer sustratos tanto para la producción de energía en el metabolismo, como en la producción de moléculas derivadas de lípidos, como lipoproteínas, sales biliares y hormonas (Pol *et al.* 2014), también pueden participar en el almacenamiento temporal de proteínas membranales no plegadas que posteriormente son degradadas en el proteosoma, así como en la respuesta de estrés en el RE y la glicosilación de proteínas (Walther y Farese, 2012; Wilfling *et al.* 2014).

Así mismo, a las LDs se les ha involucrado también en el proceso de infección de algunos patógenos, como rotavirus, el virus de la hepatitis C y el virus del dengue, los cuales son capaces de inducir un aumento en la síntesis de lípidos y estimular la biogénesis de las LDs, que mediante su asociación con proteínas estructurales y no estructurales de estos virus pueden participar durante el empaquetamiento del genoma viral y el ensamblado de las nuevas partículas virales (Cheung *et al.* 2010; McLauchlan, 2009; Samsa *et al.* 2009).

II. ANTECEDENTES

En años recientes se ha avanzado en el conocimiento más preciso de los mecanismos moleculares empleados por rotavirus para infectar exitosamente a las células. Recientemente se describió que el sistema de transporte vesicular mediado por la maquinaria COPI/ARF1 está relacionado estrechamente con la replicación de rotavirus, ya que la inhibición por RNAi de 2 de las subunidades de COPI (COP- α y COP- β), así como de ARF1, puede reducir la infectividad (número de células infectadas) del virus alrededor de un 70% (Silva-Ayala *et al.* 2013).

Además de esto, para poder determinar si estas proteínas celulares eran requeridas para la entrada del virus o durante un paso posterior, en este trabajo se introdujeron mediante lipofección a DLPs en células inhibidas con RNAi. Las DLPs son partículas no infecciosas debido a la falta de la capa exterior de proteínas (VP7 y VP4), las cuales pueden iniciar un ciclo de replicación al ser introducidas directamente a las células mediante lipofección, método por el cual es posible introducir directamente estas partículas al citoplasma sin depender de la endocitosis de virus. De esta forma, se encontró que la infectividad producida por la transfección de DLPs, también puede reducirse con la inhibición por RNAi de los componentes de la maquinaria COPI/ARF1, sugiriendo que estas proteínas son requeridas en un paso posterior a la entrada del virus (Silva-Ayala *et al.* 2013).

Por otro lado, también se ha encontrado que el tratamiento con un inhibidor como Brefeldina A, capaz de bloquear la actividad de COPI al inhibir la activación de ARF1 (Beck *et al.* 2009; Mossessova *et al.* 2003), puede reducir hasta en un 99.5% la producción de virus infeccioso y además causar distintos efectos en los procesos de modificación post-traduccionales de las proteínas virales asociadas al RE (NSP4 y VP7), las cuales sufren un incremento en su peso molecular, además de lo cual VP7 pero no NSP4, demostró adquirir resistencia al corte de endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (endo H) (Mirazami *et al.* 1996), la cual es una enzima capaz de cortar y liberar los oligosacáridos con un alto contenido de manosa que se encuentran unidos a las proteínas, pero que es incapaz de retirar oligosacáridos complejos (Freeze, 1999), sugiriendo con esto que para VP7 el procesamiento de la cadena de oligosacáridos puede afectarse por la actividad de BFA. Así mismo, la actividad de BFA bloquea la maduración de las partículas intermedias envueltas, las cuales se acumulan dentro del interior del RE (Mirazami *et al.* 1996).

A pesar de toda esta información todavía no se ha podido establecer un mecanismo claro por el cual el complejo COPI participa en el ciclo de replicación de rotavirus. Debido a esto, en este trabajo se presenta un estudio más detallado sobre los efectos de los componentes del complejo COPI en la replicación del virus, para así poder entender mejor su papel en este proceso.

III. HIPÓTESIS

El complejo de proteínas COPI está involucrado en la morfogénesis de rotavirus.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Identificar las etapas del ciclo de replicación de rotavirus afectadas por la disrupción del complejo de proteínas COPI.

4.2. Objetivos específicos

Analizar el efecto de inhibidores de la actividad del complejo COPI en:

1. La infectividad de rotavirus.
2. El rendimiento de la producción de progenie viral.
3. La síntesis de proteínas estructurales del virus.
4. El ensamblado de partículas virales.

V. METODOLOGÍA

5.1. Línea celular y cepas virales

La línea celular MA104, derivada de epitelio renal de mono verde (*Cercopithecus aethiops*), fue cultivada en advanced DMEM (Dubecco's modification of Eagle's minimal essential medium) (Gibco, México), suplementado con 5% V/V de suero fetal bovino (Gibco, México). Los cultivos se realizaron en una cabina de flujo laminar y fueron incubados a 37°C con 5% de CO₂. Las cepas de rotavirus de simio RRV, SA11 y SA11CL28 fueron propagadas en las células MA104 en MEM (Sigma-Aldrich, México), para lo cual el inóculo viral fue activado mediante incubación con 10 µg/ml de tripsina (1%) a 37°C por 30 min. El virus activado se adicionó sobre las células y se incubó por una hora a 37°C, después de ese tiempo se removió el inóculo, se adicionó MEM fresco y se incubó por 20 h a 37°C en 5% de CO₂. Las células infectadas se congelaron y descongelaron dos veces con el fin de liberar tanto el virus intracelular como el adherido a las membranas y posteriormente el lisado fue centrifugado para retirar los restos celulares. El lisado viral obtenido fue titulado y almacenado en alícuotas a -70°C.

5.2. Anticuerpos y reactivos

En este trabajo se utilizaron los anticuerpos monoclonales M60 y 159 que pueden reconocer la forma monomérica y trimérica de VP7, respectivamente. Además de estos, también se empleó un suero policlonal generado contra las partículas de rotavirus (anti-TLPs), así como anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína viral NSP2 o contra vimentina. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos acoplados a Alexa Flúor 488, Alexa Flúor 568 y Alexa Flúor 647 (Molecular Probes, EUA).

Por otro lado, para el bloqueo de la función de COPI se utilizó el inhibidor Brefeldina A (BFA) de Sigma (B7651), así como la Golgicida A (GCA) de Calbiochem (345862).

5.3. Ensayos de infectividad de rotavirus

Monocapas celulares crecidas en placas de cultivo de 96 pozos fueron lavadas con MEM e infectadas con 1000 unidades formadoras de focos (UFF) de rotavirus por pozo, durante una hora a 37°C (virus activado con tripsina, como se describió anteriormente). Al término del tiempo de infección, las células fueron lavadas una vez con MEM e incubadas en medio MEM fresco a 37°C con 5% de CO₂ por 12 h.

Después del tiempo de incubación, las células fueron fijadas con acetona al 80% V/V por 20 min a temperatura ambiente y procesadas para determinar las UFF/pozo mediante un ensayo de inmunoperoxidasa. Para este procedimiento, las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-TLPs y posteriormente con proteína A peroxidasa. La actividad de la peroxidasa fue revelada con amino-etil-carbazol (AEC) (1 mg/ml) en amortiguador 50mM de acetato de sodio, pH 5.0 y 0.04% de H₂O₂.

El conteo de las células infectadas o UFF fue realizado con una amplificación 40X en un microscopio invertido (Leika, Alemania), recorriendo los campos contenidos a lo largo de una banda central del pozo.

5.4. Determinación de progenie viral infecciosa de rotavirus

Se infectaron, monocapas de células tratadas con los distintos inhibidores, crecidas en una placa de cultivo de 48 pozos, con los distintos virus a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 como se describió anteriormente e incubadas por 12 h a 37°C con 5% de CO₂. Al final del periodo de incubación, las células fueron congeladas y descongeladas dos veces, después de lo cual el lisado se pasó a tubos estériles y se centrifugó para retirar los restos celulares. Finalmente, las UFF/ml de la progenie infecciosa viral producida fueron determinadas por medio del ensayo de inmunoperoxidasa descrito anteriormente.

5.5. Viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada usando el ensayo de lactato dehidrogenasa (LDH) Kit TOX-7 (Sigma-Aldrich, México). Para este procedimiento, 50 µl del medio extracelular fue retirado de las células y puesto en una placa de 96 pozos, las células fueron lisadas por 45 min a 37°C con 50 µl del amortiguador de lisis del kit diluido 1:10 en MEM, después de lo cual el lisado fue diluido 5 veces. Para la medición de la LDH citoplasmática y extracelular, se agregaron 50 µl de una mezcla formada por ácido láctico (sustrato), un colorante tipo tetrazolio y el cofactor NAD⁺. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, la reacción fue detenida con 15 µl de HCl 0.1N y la absorbancia de las muestras fue leída a 490 y 610 nm en un lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Alemania).

La LDH reduce el cofactor NAD⁺ para producir NADH, el cual posteriormente convierte de forma estequiométrica al colorante de tipo tetrazolio en un compuesto coloreado cuya concentración puede medirse a 490 nm.

Debido a que la medición a 610 nm puede detectar parte de la señal de fondo de las muestras, a los valores de las absorbancias obtenidas a 490 nm se les sustrajo el valor de las absorbancias a 610 nm y los valores obtenidos fueron utilizados para la determinación de la cantidad de LDH liberada mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de LDH liberada} = \left(\frac{\text{Abs del medio extracelular}}{\text{Abs del medio extracelular} + \text{Abs del lisado}} \right) \times 100$$

5.6. Análisis de proteínas por Western blot

Para este ensayo, las monocapas de las células MA104 infectadas a una MOI de 3 en presencia o ausencia de los inhibidores, fueron lisadas con amortiguador Laemmli 1x (Laemmli, 1970) con 5% de β -mercaptoethanol, para cosechar las proteínas virales producidas. Posteriormente, el lisado de las muestras fue desnaturalizado por 5 min en agua hirviendo y sujeto a electroforesis de SDS-PAGE con geles de 4 y 10%; las proteínas separadas en el gel de electroforesis fueron transferidas a una membrana Immobilon NC (Millipore) utilizando una corriente de 150 mA por 1 h.

Después de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas toda una noche a 4°C con 5% de leche baja en grasa Carnation (Nestle) en PBS y consecutivamente incubadas con los anticuerpos primarios (anti-TLPs y anti-vimentina) diluidos en PBS, adicionado con 0.1% de Tween 20, toda una noche a 4°C en agitación. Al final de este periodo, las membranas fueron lavadas tres veces con la solución de PBS-Tween 0.1% y posteriormente incubadas con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa Flúor 647 por 1 h a temperatura ambiente en agitación y los anticuerpos fueron detectados mediante el escaneo de las membranas en una unidad Typhoon Trio (Amersham biosciences, Alemania).

5.7. Enriquecimiento de partículas virales

Se crecieron células MA104 a confluencia en frascos de 75 cm² y posteriormente fueron infectadas con RRV (MOI de 5) a 4°C por 1 h, después de lo cual fueron incubadas a 37°C. A diferentes tiempos post-infección, las células fueron lavadas con EGTA (3 mM) por 5 s antes de ser cosechadas mediante dos ciclos de congelación y descongelación.

Los lisados obtenidos fueron centrifugados a 30,000 rpm (104,630 x g) en un rotor 45Ti, 4°C por 1 h en una ultracentrífuga (Beckman coulter modelo Optima L-90, México). Al final del tiempo de centrifugación, se retiró el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió

en 500 µl de amortiguador TNC (10 mM de Tris pH 7.5, 140 mM de NaCl y 10 mM de CaCl₂). Una vez disuelto, éste fue sometido a una extracción con un volumen igual de Freón 113 en donde la fase acuosa fue recuperada.

Las partículas obtenidas en la fase acuosa de la extracción fueron colocadas sobre un 1 ml de sacarosa al 40% y centrifugadas a 40,000 rpm (194,432 x g) en un rotor SW55Ti por 2 h. Posteriormente, la sacarosa fue retirada y las partículas purificadas fueron resuspendidas en 50 µl de TNC.

5.8. Purificación de partículas virales por centrifugación isopícnica.

Se crecieron células MA104 a confluencia en frascos de 150 cm² y posteriormente fueron infectadas con RRV (MOI de 5) a 37°C por 1 h. Al término de este tiempo, se realizó un lavado con MEM y las células fueron incubadas de nuevo a 37°C. A las 12 horas post-infección (hpi) las células fueron cosechadas mediante dos ciclos de congelación y descongelación. Los lisados virales obtenidos fueron centrifugados a 30,000 rpm (104,630 x g) en un rotor 45Ti y 4°C por 1 h en una ultracentrífuga (Beckman coulter modelo Optima L-90, México).

Al final del tiempo de centrifugación, se retiró el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 500 µl de amortiguador TNC, una vez disuelto éste fue sometido a una extracción con un volumen igual de Freón 113 en donde la fase acuosa obtenida fue recuperada.

En la fase acuosa obtenida se diluyeron 2.2 g de CsCl, las muestras se llevaron a un volumen de 5 ml y posteriormente fueron centrifugadas a 36,000 rpm (157,490 x g) por 18 h y 4°C en un rotor SW55Ti. Las partículas virales obtenidas en los gradientes fueron recuperadas mediante la punción de las bandas visualizadas, las cuales fueron posteriormente desaladas empleando columnas de sephadex G25.

5.9. Ensayo de inmunofluorescencia

Para este ensayo se crecieron células MA104 a confluencia en cubreobjetos de vidrio previamente esterilizados con UV por 1200 s en un UV crosslinker (Spectrolinker™ XL-1000, Spectronics Corporation, Estados Unidos), las cuales posteriormente fueron infectadas con rotavirus a una MOI de 1 durante 1 h a 37°C, como se describió anteriormente. A las 6 hpi, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% por 20 min a temperatura ambiente y permeabilizadas por 15 min a 37°C con 0.5% V/V de Tritón

X-100 en un amortiguador de bloqueo (1% P/V de albumina sérica bovina (BSA) diluida en amortiguador de fosfatos (PBS) con 50 mM de NH_4Cl).

Posteriormente, las células fueron incubadas por 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios respectivos (M60, 159 o anti-NSP2), los cuales fueron diluidos en el amortiguador de bloqueo, consecutivamente las monocapas fueron lavadas 4 veces con 50 mM de NH_4Cl e incubadas con los anticuerpos secundarios acoplados a Alexa Flúor 488 o Alexa Flúor 568 por 1 h a temperatura ambiente.

Finalmente las monocapas se incubaron con DAPI (30 nM) y los cubreobjetos fueron montados con CitiFluor AF1 antifadent (Electron Microscopy Sciences) en portaobjetos. Las muestras fueron observadas bajo un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axioskop 2, Alemania) acoplado a una cámara digital (Photometrics Cool Snap HQ). Las imágenes obtenidas fueron procesadas mediante el software Image J 1.47v (Schneider *et al.* 2012).

VI. RESULTADOS

6.1. La inhibición de la actividad de COPI con Brefeldina A disminuye la infectividad de rotavirus.

La actividad del complejo COPI puede ser bloqueada mediante inhibidores de la actividad del factor GBF1, como Brefeldina A (BFA) y Golgicida A (GCA), los cuales son capaces de unirse al complejo ternario formado por GBF1-ARF1-GDP, bloqueándolo en un paso en que es incapaz de intercambiar el GDP por GTP para la activación de la GTPasa ARF1. Esto inhibe los pasos del transporte vesicular retrogrado al causar la disociación de la maquinaria de COPI/ARF1 de la membrana (Hsu y Yang, 2009; Beck *et al.* 2009; Sáenz *et al.* 2009; Mossessova *et al.* 2003).

ARF1 en su forma inactiva (unido a GDP) se encuentra localizada en el citoplasma, a partir de donde interacciona con diferentes intercambiadores de nucleótidos capaces de modular su activación mediante la unión a GTP (Donaldson y Jackson, 2011). Por un lado, los factores BIG1 y BIG2 (del inglés, Brefeldin A-inhibited GEF 1 y 2) promueven la unión de ARF1 a la membrana del trans-Golgi para promover el reclutamiento de componentes de vesículas como AP-1 (del inglés, Adaptor protein 1) y GGA3 (del inglés, Golgi associate gamma adaptin 3), importantes en el transporte del Golgi a los endosomas, mientras que el factor GBF1 está encargado de promover la unión de ARF1 a la membrana cis-Golgi, necesaria para el reclutamiento del complejo COPI involucrado en el transporte retrogrado Golgi-RE. Aunque los inhibidores BFA y GCA poseen una gran similitud en sus efectos sobre el transporte vesicular, BFA es un inhibidor capaz de bloquear la actividad tanto de los factores BIG1 y BIG2 como de GBF1, provocando la dispersión de COPI del cis-Golgi, así como la dispersión de los factores AP-1 y GGA3 del trans-Golgi; mientras que GCA es un inhibidor más específico para el factor GBF1 ya que no afecta a los factores ubicados en el trans-Golgi (Sáenz *et al.* 2009; Popoff *et al.* 2011).

Como una primera aproximación para conocer los posibles efectos del bloqueo de la actividad de COPI/ARF1 sobre el ciclo de replicación de rotavirus, se empleó un ensayo para medir la infectividad de este virus en presencia de BFA y GCA. El ensayo para cuantificar la infectividad del virus está basado en la detección con anticuerpos de la síntesis de proteínas virales (ver Materiales y Métodos), por lo que a través de este ensayo se pueden detectar defectos en la entrada del virus, en la transcripción de su genoma y en la traducción de los mRNAs virales (síntesis de proteínas).

Para este ensayo, las células fueron tratadas por 30 min con diferentes concentraciones de BFA o GCA y posteriormente infectadas con la cepa RRV (1000 UFF/pozo) en presencia de los respectivos inhibidores por 1 h, al fin de este tiempo se retiró el virus no internalizado y se añadió medio nuevo con el inhibidor indicado. A las 12 hpi las células fueron fijadas y la infectividad (número de células infectadas) fueron determinadas por medio de un ensayo de inmunoperoxidasa.

De esta manera, cuando las células se trataron con BFA se encontró que las concentraciones de 0.1, 0.5 y 2.5 10 µg/ml no alteraron la infectividad de rotavirus de forma significativa, sin embargo para una concentración de 10 µg/ml, este inhibidor logró reducir significativamente la infectividad del virus (Figura 6a).

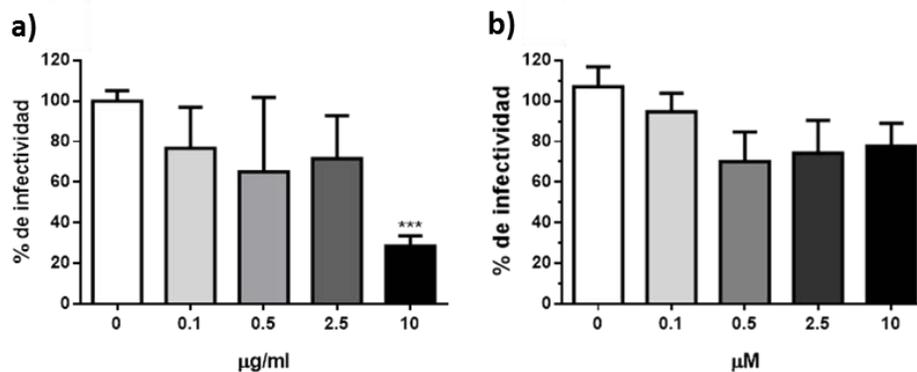


Figura 6.- La infectividad de rotavirus es reducida por BFA pero no por GCA. Las células MA104 fueron tratadas por 30 min con diferentes concentraciones de (a) BFA o (b) GCA. Posteriormente, las células se infectaron con la cepa RRV (1000 UFF/pozo) en presencia de los respectivos inhibidores por 1 h y después de retirar el virus no internalizado se añadió medio nuevo con el inhibidor indicado. A las 12 hpi las células fueron fijadas y las células infectadas (UFF) fueron determinadas por medio de un ensayo de inmunoperoxidasa. La infectividad se expresa como el porcentaje de células infectadas con respecto al número de las células infectadas en el control, que fue tomado como el 100% de infectividad. Los valores representan la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante una prueba t de Dunnett's y el programa GraphPad Prism. *** P < 0.001.

Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de GCA, se encontró que este inhibidor no afectó la infectividad de rotavirus, ya que ninguna de las concentraciones utilizadas logro disminuir la infectividad de forma significativa (Figura 6b).

Por otra parte, para demostrar que los inhibidores no afectan la integridad celular, se analizó el efecto de los fármacos BFA y GCA sobre la viabilidad celular mediante ensayos de liberación de LDH, el cual es un indicador de la integridad de la membrana en función de la cantidad de LDH liberada al medio (Legrand *et al.* 1992).

Las células MA104 fueron tratadas con diferentes concentraciones de cada uno de los inhibidores por 12 h. Para todas las concentraciones probadas tanto de BFA como de GCA, se encontró que ninguna de estas afecta de forma significativa la viabilidad celular, ya que independientemente de la concentración de inhibidor utilizado, el porcentaje de LDH liberado al medio fue muy similar al obtenido en las células crecidas en ausencia de los inhibidores (Tabla 1). Esto demuestra que la integridad de las células no se ve afectada por los tratamientos con estos inhibidores.

Tabla 1.- El tratamiento con BFA o GCA no altera la viabilidad celular. Las células MA104 fueron incubadas en ausencia o presencia de BFA o GCA durante 12 h y la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de liberación de LDH. Para este ensayo, se determinó tanto la cantidad de LDH liberada al medio extracelular como la de LDH intracelular, el porcentaje de LDH liberado se expresó en relación al LDH total (LDH intracelular más el LDH liberado). Los valores representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

BFA ($\mu\text{g/ml}$)	% de LDH liberada	GCA (μM)	% de LDH liberada
0	0.83 ± 0.26	0	2.20 ± 0.91
0.1	1.14 ± 0.19	0.1	4.76 ± 1.39
0.5	1.81 ± 0.12	0.5	2.01 ± 0.49
2.5	1.49 ± 0.54	2.5	4.08 ± 1.91
10	1.80 ± 0.06	10.0	2.13 ± 0.65

6.2. El tratamiento con BFA o GCA disminuye de manera significativa la producción de progenie viral infecciosa de rotavirus.

Por otra parte para conocer si el bloqueo de la actividad de COPI provocado por BFA y GCA pudiera tener algún efecto sobre producción de virus, se cuantificó la progenie viral infecciosa producida en presencia o ausencia de estos inhibidores. Al igual que en el ensayo de infectividad, las células fueron tratadas por 30 min con diferentes concentraciones de BFA o GCA y posteriormente infectadas con la cepa RRV (MOI de 5) en presencia de los respectivos inhibidores por 1 h, al fin de este tiempo se retiró el virus no internalizado y se añadió medio nuevo con el inhibidor indicado. A las 12 hpi las células fueron lisadas y se cuantificó por medio de un ensayo de inmunoperoxidasa la cantidad de virus infeccioso producido (UFF/ml).

Al analizar la cantidad de progenie viral infecciosa producida por la cepa RRV de rotavirus en las células tratadas con BFA, se encontró que desde la concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ se disminuye significativamente la progenie viral alrededor de un 80%, llegando a disminuirse hasta más del 99% de la progenie para las concentraciones de 0.5 a 10 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 7a).

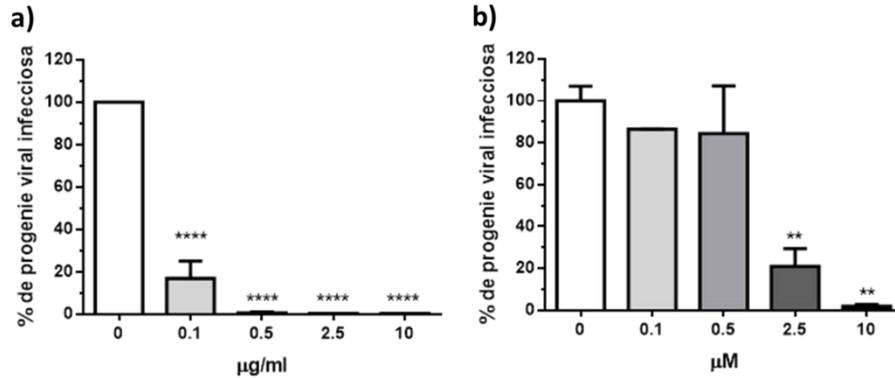


Figura 7.- El tratamiento con **a)** BFA o **b)** GCA reduce de progenie viral infecciosa de rotavirus. Las células MA104 fueron tratadas por 30 min con diferentes concentraciones de los inhibidores. Posteriormente, se infectaron con RRV (MOI de 5) en presencia de los fármacos por 1 h y después de retirar el virus no internalizado se añadió medio nuevo con el inhibidor indicado. La progenie viral producida a las 12 hpi fue recuperada y la cantidad de virus infeccioso fue cuantificado mediante un ensayo de inmunoperoxidasa. La cantidad de progenie viral infecciosa se expresa como porcentaje en relación a la progenie viral infecciosa de las células control, que se estableció como el 100%. Los valores representan la media más la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante una prueba t de Dunnett's y el programa GraphPad Prism. **** P < 0.0001; ** P < 0.01.

Sin embargo, para GCA se encontró que mientras las concentraciones de 0.1 y 0.5 µM no alteraron la progenie viral, las concentraciones de 2.5 y 10 µM redujeron significativamente la progenie viral de rotavirus, la cual para fue reducida hasta en más de un 99% para 10 µM (Figura 7b).

Aunque ambos inhibidores tuvieron un efecto notorio en la producción del virus infeccioso, se requirió de un menor concentración de BFA que de GCA. Mientras que BFA redujo más del 99% la progenie viral a una concentración de 0.5 µg/ml (1.78 µM), la GCA logró una reducción similar de la progenie viral solamente cuando se utilizó una concentración alrededor de cinco veces mayor (10 µM) a la empleada con BFA.

La diferencia entre los efectos de estos dos fármacos sobre la progenie viral podría deberse a que la BFA, al ser menos específica en su actividad, pudiera afectar funciones de COPI y aún de otros factores celulares, que no se afectan con GCA. Esto podría causar un efecto negativo adicional en el ciclo de replicación de rotavirus que contribuyera a una mayor disminución en la producción de progenie y que pudiera también reflejarse en la disminución observada de la infectividad del virus.

Debido a que las concentraciones de 0.5 µg/ml de BFA y 10 µM de GCA fueron las concentraciones más bajas a las cuales se pudo reducir más del 99% la progenie viral sin afectar la infectividad de rotavirus, estas concentraciones fueron seleccionadas para ser utilizadas en experimentos posteriores.

6.3. La reducción de la progenie infecciosa de rotavirus provocada por BFA y GCA está relacionada con el ensamblado de partículas virales.

Con el fin de conocer si los efectos de los inhibidores BFA y GCA en la producción viral infecciosa podrían estar relacionados con eventos de entrada del virus a la célula o a pasos posteriores del ciclo de replicación de rotavirus, se evaluó el efecto en la producción de la progenie viral cuando estos inhibidores fueron añadidos a diferentes tiempos post-infección.

Durante este ensayo se observó que la adición de los inhibidores a las 0 y 2 hpi reduce más del 90% la progenie viral infecciosa (Figura 8). Sin embargo, el efecto de BFA y GCA sobre el rendimiento viral comenzó a disminuir cuando estos inhibidores se añadieron a partir de las 4 hpi, en donde inhibieron solamente el 60% de la producción viral. A partir de este tiempo, se encontró que mientras BFA no tuvo ningún efecto en la producción viral cuando se añadió a las 6 y 8 hpi, la actividad de GCA se mantuvo a estos tiempos, en los cuales redujo alrededor del 60% de la progenie viral.

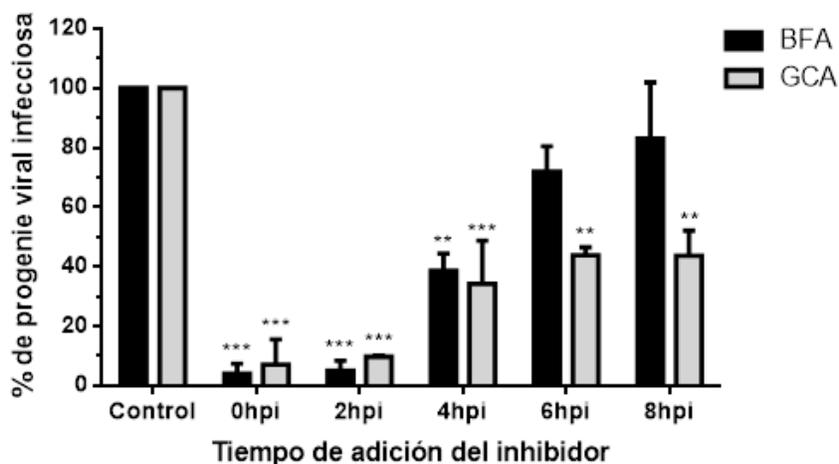


Figura 8.- La reducción de la progenie viral de rotavirus provocada por BFA y GCA disminuye cuando los inhibidores son adicionados después de las 4 hpi. Las células fueron infectadas con RRV (MOI de 5) a 37°C por 1 h, posteriormente se retiró el virus no internalizado y las células fueron incubadas a 37°C. A las diferentes horas pos-infección (hpi) indicadas se reemplazó el medio cultivo por medio suplementado con 0.5 µg/ml de BFA o 10 µM de GCA. A las 12 hpi la progenie viral producida en cada condición fue recuperada y la cantidad de virus infeccioso fue cuantificado mediante un ensayo de inmunoperoxidasa. La cantidad de progenie viral infecciosa se expresa como porcentaje en relación a la progenie viral infecciosa de las células control, que se estableció como el 100%. Los valores representan la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante una prueba t de Dunnett's y el programa GraphPad Prism. *** P < 0.001; ** P < 0.01.

La disminución significativa de la progenie viral observada aun cuando BFA y GCA fueron adicionados a las 2 hpi, sugiere que el efecto de estos inhibidores muy probablemente está asociado a un proceso posterior a la entrada del virus a la célula, ya que de acuerdo con la cinética de entrada del virus, a éste le toma alrededor de 60 min para entrar y perder la capa más externa de proteínas (Silva-Ayala *et al.* 2013).

Por otra parte, se evaluó la cinética de aparición de las nuevas partículas virales durante el ciclo de replicación de rotavirus. Para esto, el virus RRV se adsorbió a 4°C por 1 h, temperatura a la cual el virus se une a la superficie celular pero no se endocita, y posteriormente se incubaron a 37°C para permitir el inicio sincrónico de la infección. A diferentes tiempos post-infección, las células se lavaron rápidamente con EGTA para despegar los virus que no hubieran entrado a la célula pero permanecieran unidos a la superficie celular, para que esta forma puedan detectarse solamente la aparición de las nuevas partículas ensambladas y no las que se añadieron durante la infección. Después del lavado con EGTA, las partículas virales producidas se semi-purificaron por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa. En este proceso las partículas ensambladas sedimentan en el fondo del colchón de sacarosa, mientras que las proteínas celulares y las proteínas virales no ensambladas permanecen en la parte superior.

De esta forma se encontró que la formación de las nuevas partículas virales comienza alrededor de las 4 hpi, habiéndose ya ensamblado la mayoría de las partículas a las 6 y 8 hpi (Figura 9). Estos datos en conjunto con lo encontrado al adicionar los inhibidores a distintas horas pos-infección, sugieren que el efecto de BFA y GCA muy probablemente esta relacionado a la morfogénesis de las nuevas partículas virales, ya que cuando los inhibidores son adicionados después de la aparición de las nuevas partículas ensambladas (4 hpi), estos tienen un menor efecto en el rendimiento de la progenie viral.

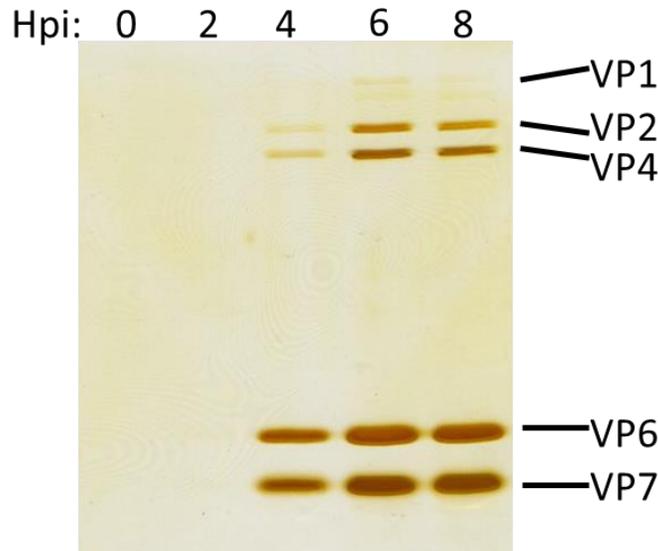


Figura 9.-La aparición de nuevas partículas de rotavirus comienza a partir de las 4 hpi. Las células se incubaron con RRV (MOI de 5) a 4 °C por 1 h, subsecuentemente se retiró el virus no unido y las células fueron incubadas a 37°C. A los tiempos post-infección indicados, las células fueron lavadas con EGTA (3 mM) por 5 s para retirar las partículas virales externas que pudieran encontrarse unidas a la membrana plasmática. Posteriormente las células fueron lisadas y las partículas virales producidas en los lisados fueron extraídas con Freón 113 y purificadas mediante ultracentrifugación por un colchón de sacarosa al 40%. Imagen representativa de 2 experimentos independientes.

6.4. El tratamiento con BFA o GCA altera la movilidad electroforética de VP7.

Con el fin de conocer si los efectos de BFA y GCA en el rendimiento viral y posiblemente en el ensamblado de las nuevas partículas virales podrían deberse a una alteración en las proteínas estructurales del virus, estas proteínas fueron evaluadas por medio de SDS-PAGE y Western blot.

De esta forma se encontró que el tratamiento de las células con los inhibidores no parece afectar a las proteínas VP2, VP4 y VP6. Sin embargo, la glicoproteína VP7 pareciera estar en una menor cantidad en las células tratadas a comparación con las condiciones control, además de lo cual se encontró que BFA y GCA también provocaron una disminución en la movilidad electroforética de esta glicoproteína, la cual en ausencia de los inhibidores demostró poseer un peso aproximado de 35.7 kDa, mientras que en presencia de BFA y GCA esta proteína sufrió un aumento de 3.3 kDa ya que fue detectada como una proteína con un peso de aproximadamente 39 kDa (Figura 10a y 10b).

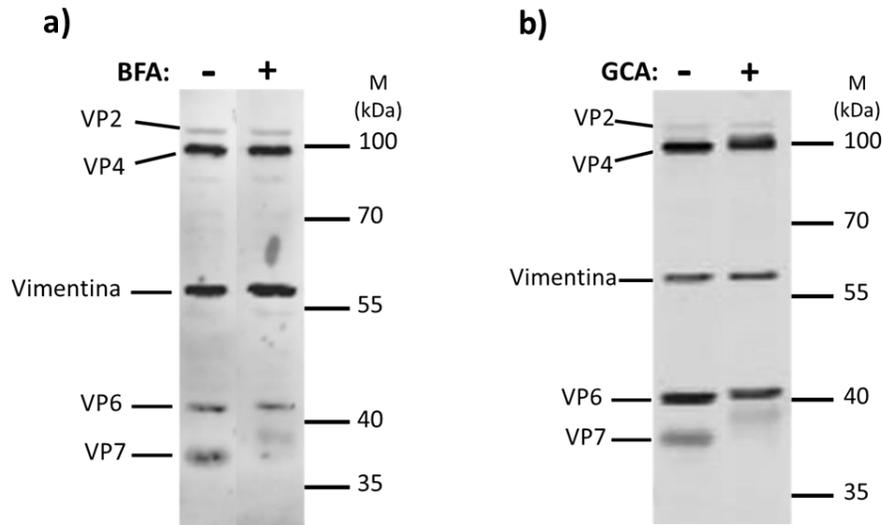


Figura 10.- El tratamiento con BFA y GCA altera la movilidad electroforética de VP7. Células MA104 fueron tratadas con **a)** BFA (0.5 $\mu\text{g/ml}$) o **b)** GCA (10 μM) por 30 min y posteriormente infectadas con RRV (MOI de 5) en presencia de los inhibidores, después de retirar el virus no internalizado se repuso medio fresco con los respectivos inhibidores y se incubaron las células a 37°C. A las 8 hpi las proteínas producidas fueron cosechadas en amortiguador Laemmli 1x y posteriormente analizadas por SDS-PAGE. Subsecuentemente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa e inmunodetectadas con un anticuerpo dirigido contra las partículas virales (anti-TLPs) así como con anti-vimentina. Las posiciones relativas de las proteínas se indican en la parte izquierda. Las posiciones relativas de los marcadores (M) y sus pesos moleculares (kDa) se muestran a la derecha. Imagen representativa de 2 experimentos independientes

En un trabajo previo en el cual se caracterizó la replicación de rotavirus en presencia de BFA, se observó el cambio en la movilidad electroforética del VP7. Sin embargo, aunque no se determinó la posible causa de este cambio, se concluyó que este podría deberse a una modificación postraduccional de la cadena de carbohidratos de esta proteína, ya que durante el tratamiento con este inhibidor se encontró que VP7 adquiría, además, resistencia a endo H, una enzima que solamente puede remover cadenas de oligosacáridos de alta manosa que no hayan sido procesadas en oligosacáridos complejos dentro del aparato de Golgi. (Mirazimi *et al.* 1996; Freeze, 1999).

Aunque para GCA no existen reportes previos sobre los efectos de este inhibidor en la síntesis de proteínas de rotavirus, muy probablemente GCA pudiera estar ejerciendo un efecto similar a BFA en la modificación postraduccional de VP7, la cual pudiera ser el responsable de la alteración en su movilidad electroforética y de su menor detección.

6.5. El tratamiento con BFA o GCA bloquea la producción de partículas de TLPs.

Para conocer con más detalle el efecto de BFA y GCA sobre el ensamblado de la progenie viral infecciosa, se extrajeron y purificaron las partículas virales producidas en presencia de BFA o GCA por medio de centrifugación isopícnica en gradientes de CsCl.

Las partículas virales obtenidas en las condiciones control, en ausencia de los fármacos, produjeron dos bandas características cercanas a la parte inferior del gradiente (Figura 11a y 11c), las cuales corresponden a las partículas de doble y triple capa, que se observan normalmente en una infección por rotavirus. Al analizar las bandas por SDS-PAGE, se confirmó su correspondencia a DLPs y TLPs, ya que la banda superior (TLPs) demostró contener las proteínas VP1, VP2, VP5 (producto del corte con tripsina de VP4), VP6 y VP7, componentes de las TLPs de rotavirus, mientras que la banda inferior del gradiente contenía partículas con las proteínas características (VP1, VP2 y VP6) de las DLPs, las cuales carecían de las proteínas de capa externa (Figura 11b y 11d).

Por otro lado, en presencia de BFA o GCA (Figuras 11a y 11c) sólo se logró detectar una banda ubicada a una altura similar a la banda de DLPs del control (Figura 11a), la identidad de la cual se confirmó por electroforesis al observarse exclusivamente las proteínas VP1, VP2 y VP6, características de las DLPs, y la ausencia de las proteínas de capa externa (Figuras 12b y 12d).

Particularmente, para BFA se encontró además la presencia de dos bandas cercanas a los 70 y 55 kDa, bandas A y B, respectivamente (Figura 12b). Las cuales no fueron identificadas o analizadas con más detalle en este trabajo, ya que ambas bandas no pudieron reproducirse en todos los experimentos, muy probablemente debido a que su unión con las partículas virales es muy débil y una ligera variación durante el proceso de extracción provocaría su disociación de las partículas.

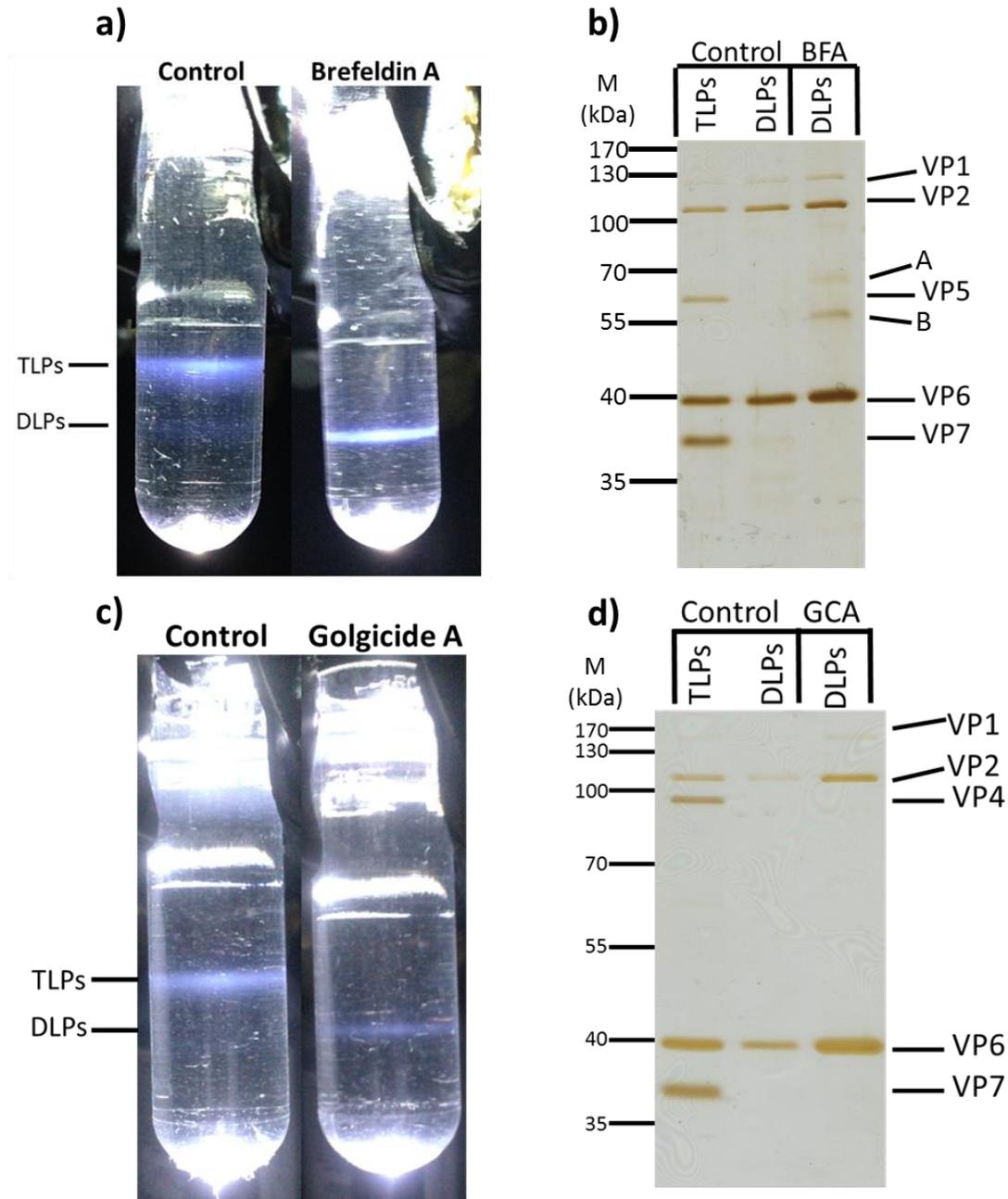


Figura 11.- El tratamiento con BFA o GCA bloquea la producción de partículas de TLPs. Gradientes de CsCl de partículas virales ensambladas en ausencia (Control) y presencia de **a)** BFA (0.5 $\mu\text{g/ml}$) o **c)** GCA (10 μM). Las células MA104 fueron tratadas por 30 min con los diferentes inhibidores. Posteriormente, se infectaron con RRV (MOI de 5) en presencia de los fármacos por 1 h y después de retirar el virus no internalizado se añadió medio nuevo con el inhibidor indicado. Las partículas virales producidas fueron extraídas con Freón 113 y purificadas mediante ultracentrifugación en gradientes de CsCl. La identificación de las partículas virales producidas en presencia de **b)** BFA o **d)** GCA en las bandas obtenidas en los gradientes se realizó mediante un análisis de SDS-PAGE. Las posiciones relativas de las proteínas se indican a la derecha. Las posiciones relativas de los marcadores (M) y sus pesos moleculares (kDa) se muestran a la izquierda. Imágenes representativa de tres experimentos independientes.

6.6. La cepa de rotavirus SA11CL28, que contiene una mutación en el sitio de glicosilación (Asparagina 69) en VP7, también es sensible a los tratamientos con BFA o GCA.

Estos resultados encontrados al analizar las partículas producidas en presencia de BFA o GCA, junto con la modificación de la movilidad de VP7 (ver Figura 10 y 11), sugieren que mientras que el ensamblado de las partículas de DLPs no se afecta por la adición de BFA o GCA, la maduración de estas partículas hacia TLPs se encuentra bloqueada, muy probablemente debido a una alteración en el procesamiento de glicosilación de VP7, como se sugirió previamente para BFA (Mirazimi *et al.*, 1996). Debido a esto, decidimos evaluar los efectos de estos inhibidores en la producción de progenie infecciosa de la cepa de rotavirus de simio SA11CL28, la cual posee una mutación en el sitio de glicosilación de VP7, que impide que esta pueda ser glicosilada (Estes *et al.* 1982).

Cuando se evaluó el efecto de BFA y GCA en la producción de virus de la cepa silvestre SA11 (SA11wt) así como en la cepa mutante SA11CL28, se encontró que ambas cepas fueron susceptibles a los tratamientos con los inhibidores (Figura 12a), los cuales lograron reducir hasta en un 99% la progenie viral producida tanto por SA11wt como SA11CL28.

La sensibilidad de las cepas de SA11 probadas durante este ensayo indica que la posible alteración en la glicosilación VP7 provocada por BFA y GCA no tiene un efecto directo sobre el ensamble de TLPs, ya que aún para la cepa SA11CL28 estos inhibidores pueden reducir la progenie viral de forma significativa.

Por otro lado, para corroborar que la cepa de SA11CL28 empleada en este ensayo poseía una proteína VP7 no glicosilada, la migración de VP7 se analizó por Western blot. En este análisis se encontró que la proteína VP7 glicosilada de la cepa SA11wt posee un peso molecular aproximado de 37.4 kDa, mientras que la proteína VP7 de SA11CL28 (sin glicosilar) tiene un peso molecular menor, el cual se determinó aproximadamente en 34.5 kDa (Figura 12b). Al analizar la diferencia de los pesos moleculares de las proteínas VP7 de estas dos cepas, se encontró que la proteína VP7 no glicosilada de SA11CL28 resultó 2.9 kDa más ligera que la proteína glicosilada de SA11, indicando que esta proteína en la cepa SA11CL28, en efecto, no se encuentra glicosilada ya que el peso aparente de una cadena de oligosacáridos promedio se encuentra entre 1.5 y 3 kDa (Freeze, 1999).

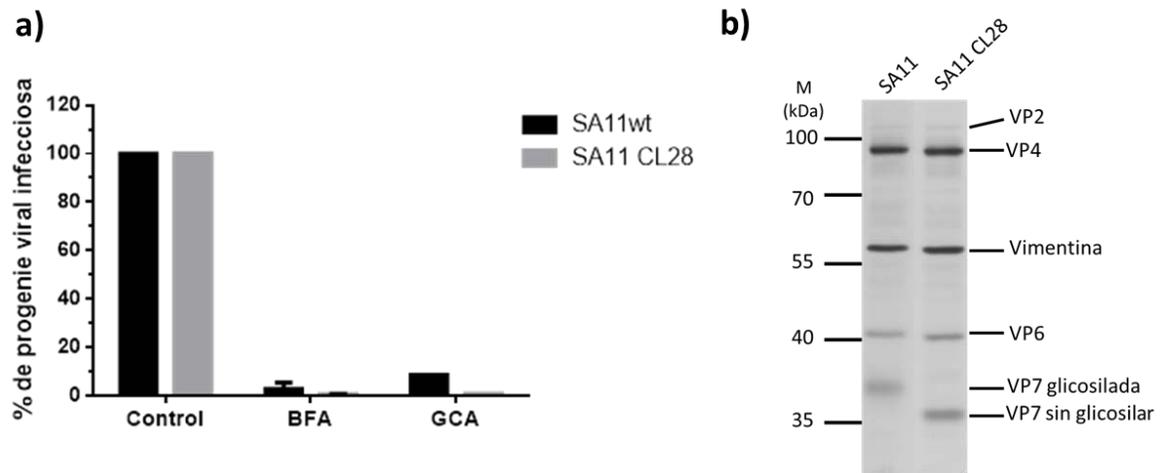


Figura 12.- El tratamiento con BFA o GCA reduce la progenie viral infecciosa de la cepa SA11 de rotavirus así como la progenie de la clona 28 de SA11. **a)** Células MA104 fueron tratadas con BFA (0.5 $\mu\text{g/ml}$) o GCA (10 μM) por 30 min a 37°C, posteriormente las células fueron infectadas a una MOI de 5 con una cepa de SA11 tipo silvestre (SA11wt) o con una cepa mutante que carece de glicosilación en VP7 (SA11CL28), todo esto en presencia de BFA y GCA. Una vez retirado el virus no internalizado se agregó medio nuevo con los diferentes inhibidores. La progenie viral producida a las 12 hpi fue recuperada y la cantidad de virus infeccioso fue cuantificado mediante un ensayo de inmunoperoxidasa. La cantidad de progenie viral infecciosa se expresa como porcentaje en relación a la progenie viral infecciosa de las células control, que se estableció como el 100%. Los valores representan la media más la desviación estándar de tres experimentos independientes. **b)** Células MA104 fueron infectadas con las cepas de SA11wt o SA11CL28 (MOI de 5) y posteriormente a las 8 hpi las proteínas producidas fueron cosechadas en buffer Laemmli 1x y procesadas por SDS-PAGE. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa e inmunodetectadas con un anticuerpo dirigido contra las partículas virales (anti-TLPs) así como con anti-vimentina. Las posiciones relativas de los marcadores (M) y sus pesos moleculares (kDa) se muestran a la izquierda. Las posiciones relativas de las proteínas se indican en la parte derecha. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

Por otra parte, aunque se ha sugerido que estos inhibidores pudieran estar alterando la glicosilación de VP7 provocando un aumento en su peso molecular, cuando se evaluaron los efectos de BFA y GCA sobre la movilidad de la proteína VP7 de las cepas SA11wt y SA11CL28 mediante Western blot, se encontró que tanto BFA como GCA alteran la movilidad electroforética de la proteína VP7 de las dos cepas, la cual durante los tratamientos con los inhibidores redujo su movilidad electroforética en comparación a la proteína VP7 de las condiciones control (Figura 13a y 13b).

Para el caso de SA11wt se encontró que el peso de la proteína VP7 aumento 2.6 kDa durante los tratamientos con BFA y GCA, ya que en presencia de estos inhibidores se pudo detectar una forma de VP7 con un peso aproximado de 40 kDa. Así mismo, los tratamientos con BFA y GCA provocaron un aumento 2.5 kDa en la proteína VP7 de SA11CL28, la cual fue detectada como una proteína con un peso aproximado de 37 kDa.

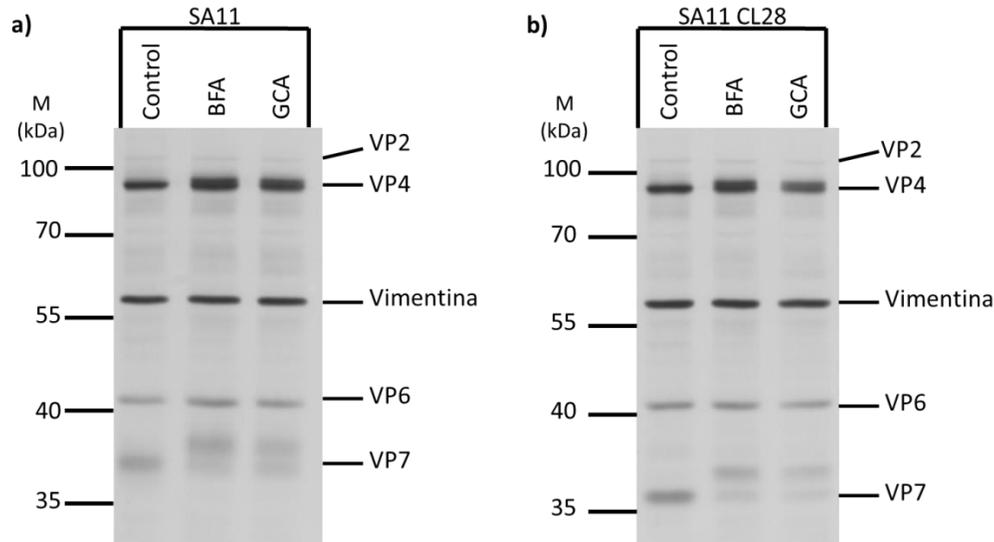


Figura 13.- El tratamiento con BFA o GCA altera la movilidad de la proteína VP7 no glicosilada de SA11CL28. Células MA104 tratadas con BFA (0.5 $\mu\text{g/ml}$) o GCA (10 μM) por 30 min fueron infectadas con SA11 o SA11CL28 (MOI de 5) en presencia de los inhibidores. Después de retirar el virus no internalizado se repuso medio fresco con los fármacos indicados y se incubaron las células a 37°C. A las 8 hpi las proteínas producidas fueron cosechadas en buffer Laemmli 1x y procesadas por SDS-PAGE. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa e inmunodetectadas con un anticuerpo dirigido contra las partículas virales (anti-TLPs) así como con anti-vimentina. Las posiciones relativas de los marcadores (M) y sus pesos moleculares (kDa) se muestran a la izquierda. Las posiciones relativas de las proteínas se indican en la parte derecha. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

Estos resultados sugieren fuertemente que el efecto de BFA y GCA sobre la proteína VP7 no se encuentra ligado a una alteración en su glicosilación, por lo que la reducción de la producción de TLPs provocada por estos inhibidores pudiera estar relacionada a una diferente alteración pos-traduccional de la proteína VP7.

6.7. El tratamiento con BFA o GCA bloquea la trimerización de VP7 y modifica su distribución intracelular.

Para investigar si una alteración de VP7 provocada por BFA y GCA pudiera impedir su incorporación a la partícula viral, se evaluó el efecto de estos inhibidores en la trimerización de VP7 mediante inmunofluorescencia. Para esto se utilizó el anticuerpo monoclonal 159 (mAb 159), que reconoce a VP7 únicamente cuando ésta se encuentra en forma trimérica, ya sea ensamblada en la partícula viral o en forma de trímeros independientes (Dormitzer *et al.* 2000). Así, las células MA104 se infectaron en presencia o ausencia de los inhibidores y se fijaron a las 6 hpi. Las células fijadas se tiñeron tanto con el mAb 159 como un anticuerpo dirigido contra la proteína NSP2 (proteína marcadora de viroplasmos) y el colorante DAPI.

Durante este ensayo se encontró que los tratamientos con BFA y GCA no afectan de forma notoria el tamaño y el número de viroplasmos marcados con la proteína NSP2, comparados con las condiciones control (Figura 14). Sin embargo, cuando se analizó la formación de los trímeros de VP7, se encontró que mientras en las condiciones control los trímeros de VP7 se detectan fácilmente con el anticuerpo mAb159 alrededor de los viroplasmos, formando una estructura de anillo, en las células tratadas con BFA o GCA no se logró detectar la presencia de la forma trimérica de VP7 (Figura 14).

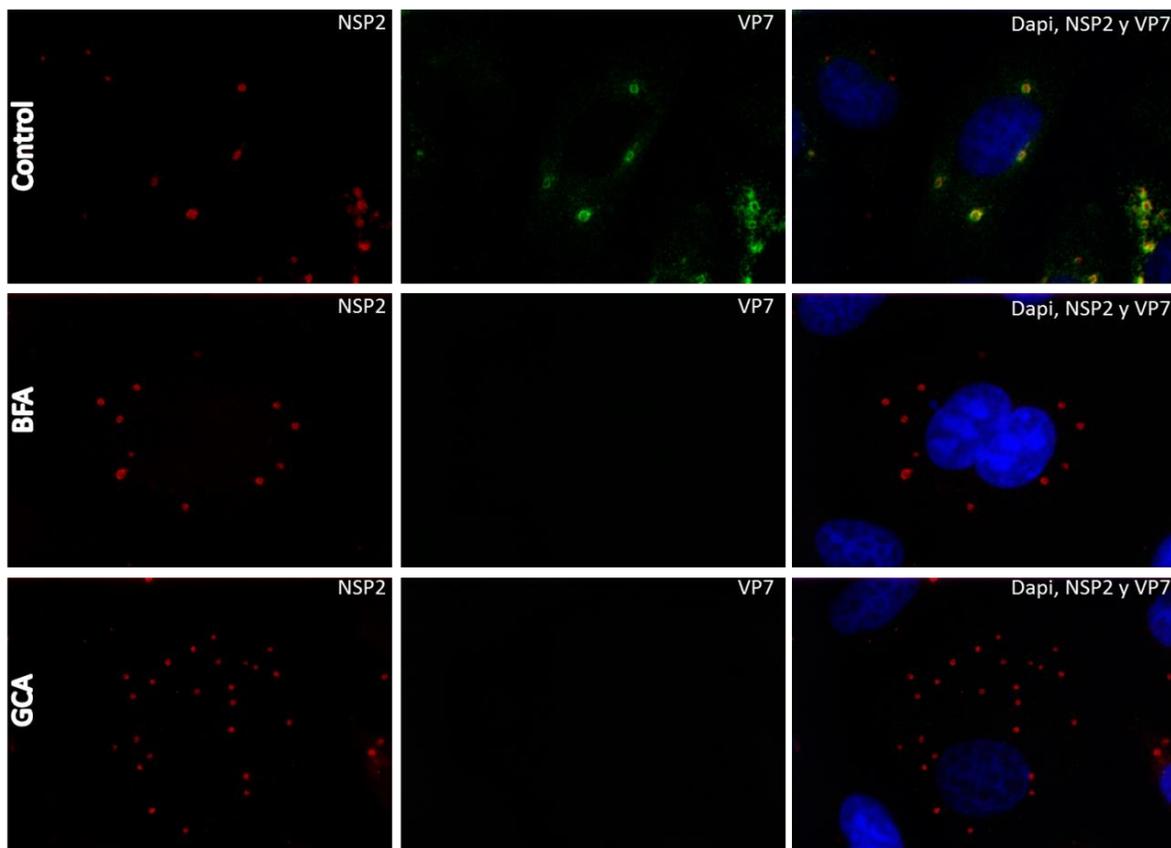


Figura 14.- Los tratamientos con BFA o GCA impiden la formación de los trímeros de VP7. Monocapas de células MA104 crecidas en cubreobjetos de vidrio fueron tratadas con BFA (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o GCA (10 μM) por 30 min y posteriormente infectadas con RRV a una MOI de 1 en presencia de los inhibidores. Después de retirar el virus no internalizado, se añadió medio nuevo con BFA o GCA. A las 6 hpi las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% e incubadas con un anticuerpo contra la proteína viral NSP2 (rojo) y con el anticuerpo mAb159 capaz de reconocer la forma trimérica de VP7 (verde), así como con DAPI y anticuerpos secundarios acoplados a Alexa flúor 488 (para VP7) y 568 (para NSP2).

Estos resultados sugieren que el bloqueo en la adquisición de la capa externa durante el ensamblado de las partículas de rotavirus en presencia de los fármacos, se debe a la inhibición de la formación de los trímeros de VP7 que, como se mencionó en la introducción, son esenciales para el ensamblado de esta proteína en la partícula viral.

Aunque en el caso de la cepa RRV, el efecto en la trimerización de VP7 pudiera deberse a la alteración del procesamiento de VP7 provocado por BFA y GCA, el cual podría provocar un mal plegamiento de VP7 que inhiba su capacidad para trimerizar, también existe la posibilidad de que estos inhibidores pudieran estar reduciendo los niveles de Ca^{2+} dentro del RE hasta una concentración en la cual la trimerización de VP7 es incapaz de llevarse a cabo.

Por otra parte, para conocer con más detalle los efectos de BFA y GCA sobre la proteína VP7 en las células infectadas, se evaluó mediante inmunofluorescencia la distribución intracelular de la forma monomérica VP7 utilizando el anticuerpo monoclonal M60 (mAb M60), el cual puede reconocer los monómeros de VP7 ya sea cuando estos están integrados en trímeros o de forma independiente (Svensson *et al.* 1994; Dormitzer *et al.* 2000).

En las condiciones control, se encontró que la forma monomérica de proteína VP7 se organiza mayormente como una estructura de anillo asociada al contorno los viroplasmata. Sin embargo, durante los tratamientos con BFA y GCA, la proteína VP7 no fue reclutada hacia la periferia de los viroplasmata, sufriendo una redistribución hacia el citoplasma de la célula, en donde se detectó de forma punteada, con una mínima asociación a los viroplasmata (Figura 15).

El cambio en la distribución intracelular de la forma monomérica de VP7 y su ausencia de la periferia de los viroplasmata parece indicar que la inhibición del transporte provocada por BFA y GCA podría estar impidiendo que VP7 se asocie a los sitios de gemación y ensamblado de las partículas virales que se encuentran estrechamente asociados a los viroplasmata, previniendo así la adquisición de la capa externa para la producción de TLPs. Será interesante ver si la trimerización y distribución de la proteína VP7 de la clona 28 de SA11 se altera de la misma manera.

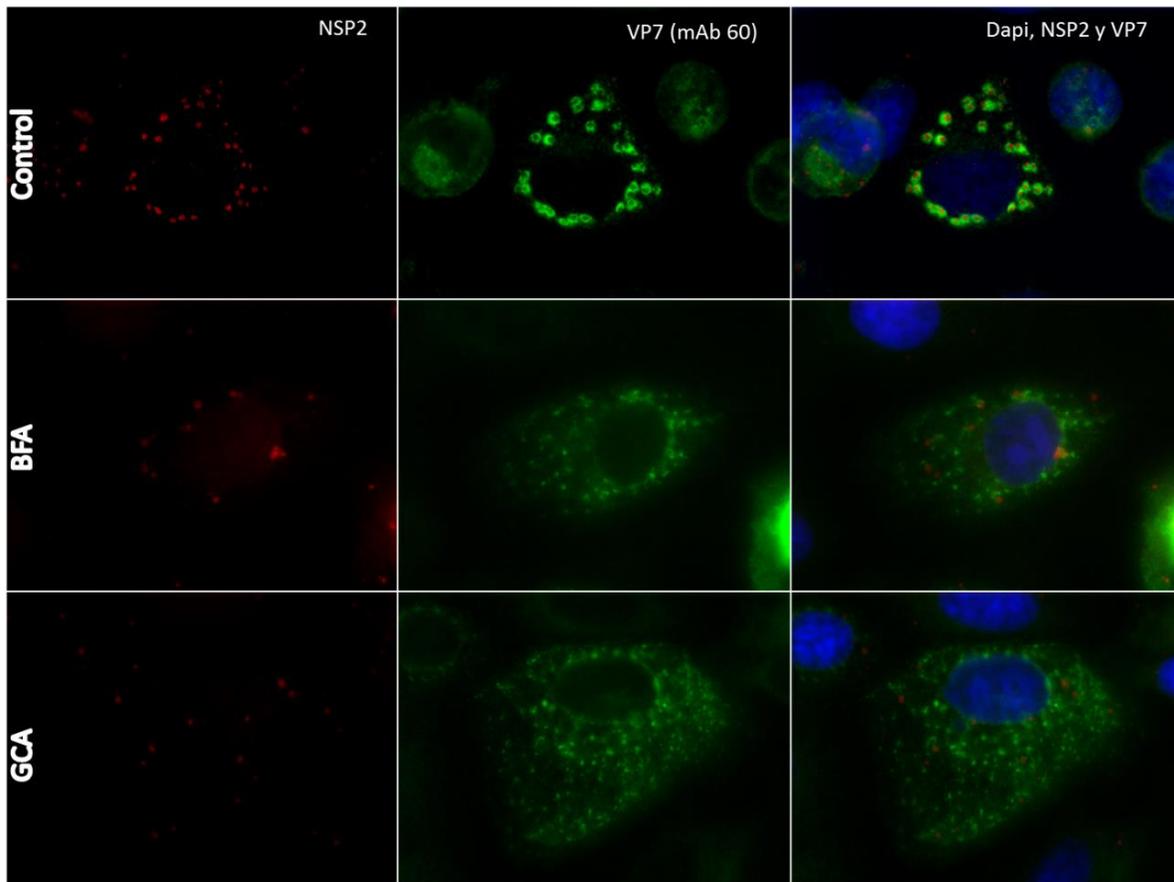


Figura 15.- El tratamiento con BFA o GCA modifican la distribución intracelular de VP7. Monocapas de células MA104 crecidas en cubreobjetos de vidrio fueron tratadas con BFA (0.5 $\mu\text{g/ml}$) o GCA (10 μM) por 30 min y posteriormente infectadas con RRV a una MOI de 1 en presencia de los inhibidores. Después de retirar el virus no internalizado, se puso medio nuevo con BFA o GCA. A las 6 hpi las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% e incubadas con un anticuerpo contra la proteína viral NSP2 (rojo) y con el anticuerpo M60 capaz de reconocer la forma monomérica VP7 (verde), así como con DAPI y anticuerpos secundarios acoplados a Alexa flúor 488 (para VP7) y 568 (para NSP2).

VII. DISCUSIÓN

Las células eucariotas utilizan un elaborado sistema para el control del tráfico de proteínas tanto en la ruta endocítica como secretoria. Dentro de este sistema, la maquinaria de COPI/ARF1 participa en varios procesos de transporte que ocurren entre el RE y el aparato de Golgi, así como entre las diferentes capas del aparato de Golgi (Beck *et al.* 2009), pudiendo además participar en eventos relacionados con la maduración y función de las LDs, entre otras funciones (Popoff *et al.* 2011).

Por otra parte, se ha descrito también que la maquinaria de COPI/ARF1 es importante para la replicación de diferentes virus, como influenza A, SV40, virus de la estomatitis vesicular (VSV), de hepatitis C (HCV) y coronavirus de hepatitis de ratón (MHV); para todos ellos, COPI/ARF1 pudiera participar tanto en los pasos de entrada de los virus a la célula (influenza A, SV40 y VSV), como en pasos posteriores, como la replicación del genoma (VSV, HCV y MHV), expresión de proteínas virales (VSV e influenza A) y el ensamblado de las partículas virales (influenza A) (König *et al.* 2010; Sun *et al.* 2013; Norkin *et al.* 2002; Cureton *et al.* 2012; Goueslain *et al.* 2010; Verheije *et al.* 2008).

Recientemente también se encontró que el complejo COPI puede estar involucrado en la replicación de rotavirus, ya que el silenciamiento de dos de sus subunidades redujo la infectividad de este virus (Silva-Ayala *et al.* 2013). En el presente trabajo se presenta evidencia de la importancia del complejo COPI en el proceso de morfogénesis de rotavirus, en particular en el ensamble de la capa externa formada por las proteínas de superficie VP7 y VP4.

Como una primera aproximación para conocer con más claridad la probable función de COPI en el ciclo de replicación de rotavirus, se realizaron algunos ensayos con siRNAs dirigidos para el silenciamiento de tres de las subunidades de COPI (COP- α , COP- β , COPI- δ). Sin embargo, se encontró que el silenciamiento de estas subunidades disminuye la viabilidad celular, resultando en un menor crecimiento y una mayor mortandad de las células tratadas con los diferentes siRNAs (resultados no mostrados). Debido a este problema se eligió utilizar a inhibidores de la función de COPI como Brefeldina A (BFA) y Golgicida A (GCA), los cuales bloquean la actividad del factor GBF1, lo que impide la activación de la proteína ARF1 y con ello los pasos del transporte vesicular de COPI (Hsu y Yang, 2009; Beck *et al.* 2009; Sáenz *et al.* 2009; Mossessova *et al.* 2003).

Cuando los inhibidores se añadieron a células MA104 durante la infección por rotavirus, se encontró que mientras BFA disminuye significativamente la infectividad del virus (alrededor de 70%) a una concentración de 10 µg/ml, las concentraciones evaluadas de GCA no alteraron la infectividad del virus.

Aunque no se puede descartar la posibilidad de algún efecto de BFA en la entrada del virus, ya que se ha reportado que este inhibidor puede afectar algunos procesos endocíticos (Klausner *et al.* 1992), los efectos de este inhibidor encontrados con la concentración de 10 µg/ml pudieran reflejar una alteración indirecta de este proceso. BFA al ser un inhibidor menos específico para COPI, capaz de bloquear el transporte de proteínas del trans-Golgi hacia los endosomas, podría estar alterando el tránsito de factores hacia los endosomas o a la membrana plasmática, los cuales son necesarios para la endocitosis del virus (Sáenz *et al.* 2009).

En contraste, ambos inhibidores afectaron de manera importante la producción de progenie viral, reduciéndola en un 99% a concentraciones de 0.5 µg/ml (BFA) y 10 µM (GCA). En conjunto, estos resultados sugieren que los inhibidores pudieran no tener un efecto sobre la entrada del virus a la célula, (al menos GCA), sino que su acción parece estar relacionada con el bloqueo de un paso posterior en el ciclo de rotavirus. Un argumento adicional que indica que el efecto principal de los inhibidores no es a nivel de la entrada del virus es que la adición de BFA o GCA, aún a las 2 hpi, produce una reducción significativa de la progenie viral. A este tiempo el virus ya ha logrado ingresar al citosol celular, lo cual ocurre en alrededor de 60 min (Silva-Ayala *et al.* 2013).

Por otra parte, la similitud de los efectos de BFA reportados en un trabajo previo, en el cual este inhibidor fue adicionado cada 4 h para evitar la pérdida de su actividad debido a su metabolización (Mirazimi *et al.* 1996), con los efectos encontrados en este estudio donde BFA no fue adicionado a lo largo de la infección, sugirió que la actividad de este inhibidor así como de GCA se encuentra involucrada con eventos ocurridos durante las primeras 4 hpi, lo cual fue confirmado al encontrar que la adición de BFA o GCA a partir de las 4 hpi resulta en una reducción mínima de la progenie viral, teniendo una actividad significativamente menor cuando estos son añadidos a las 6 y 8 hpi. Asimismo, la observación de que la aparición de nuevas partículas virales inicia alrededor de las 4 hpi apoya la idea de que el efecto primario de estos compuestos está relacionado con el ensamblado de virus.

Al indagar con mayor detalle el ensamblado de partículas virales en presencia de BFA y GCA se encontró que ambos inhibidores bloquearon el ensamble de las proteínas de la capa externa del virus, permitiendo únicamente la formación de DLPs. Aunque la causa de este bloqueo es desconocida, muy probablemente esto pudiera deberse a una alteración de la proteína VP7, ya que se encontró que la presencia de GCA y BFA durante la infección de rotavirus modificó de manera clara la movilidad electroforética de esta glicoproteína.

Previamente se había descrito que BFA es capaz de alterar la movilidad electroforética de la proteína VP7 aunque no se exploró el mecanismo a través del cual esto sucedía (Mirazimi *et al.* 1996). Nuestro hallazgo de que GCA es también capaz de alterar la movilidad de VP7, de manera similar a BFA, y considerando que GCA actúa de manera más específica sobre el factor GBF1, sugiere que el efecto de estos inhibidores es sobre este factor, cuya actividad parece ser de especial importancia para el procesamiento de VP7.

Para BFA se ha sugerido que el cambio en la movilidad electroforética de VP7 podría deberse a una alteración en el procesamiento pos-traducciona l de la cadena de oligosacáridos unida a esta proteína, el cual pudiera ser el responsable de la disminución en la progenie viral infecciosa. Sin embargo, cuando se evaluó el efecto de BFA y GCA en la clona 28 de SA11, cuya VP7 no es glicosilada, se encontró que la producción de partículas virales infecciosas de esta cepa mutante, al igual que la cepa silvestre de SA11, cuya VP7 sí esta glicosilada, es sensible al tratamiento con estos inhibidores, indicando que el efecto de los fármacos sobre la progenie viral no está relacionado directamente a la alteración de la cadena de oligosacáridos de VP7.

Por otro lado, el hecho de que la movilidad electroforética de la proteína VP7 de SA11CL28 también esté alterada, sugiere que esta alteración podría deberse a algún otro tipo de modificación pos-traducciona l. En este sentido, una posibilidad interesante es que estuviera bloqueada la remoción de los primeros 50 aminoácidos que componen el péptido señal de la proteína, los que en condiciones control se procesan durante la síntesis de la proteína en el RE. Asimismo, la movilidad diferente de VP7 en las células tratadas con ambos compuestos también pudiera deberse al favorecimiento del empleo de alguno de los dos sitios de iniciación de la traducción de VP7, promoviendo el enriquecimiento de una especie de VP7 con mayor peso molecular, que en condiciones normales se encuentra en cantidades reducidas (Stirzaker *et al.* 1987).

Independientemente de la causa de la alteración en la movilidad electroforética de VP7, ésta podría tener repercusiones importantes para el proceso de morfogénesis de rotavirus, por ejemplo impedir la trimerización de la proteína y por lo tanto su ensamble en la partícula viral.

Considerando las posibilidades mencionadas en el párrafo anterior, se decidió evaluar por inmunofluorescencia los efectos de BFA y GCA sobre la trimerización de la proteína VP7, utilizando el MAb159, que reconoce exclusivamente la forma trimérica de la proteína y el MAb 60, que interacciona con la forma monomérica (Dormitzer *et al.* 2000). Los resultados mostraron que tanto BFA como GCA bloquean completamente la formación de los trímeros de VP7, mientras que la forma monomérica de la proteína sí es detectable, aunque con una distribución intracelular alterada. Por otro lado, la formación de viroplasmos, detectados con un anticuerpo contra la proteína NSP2, no parece afectarse, cuando menos de forma notoria, durante los tratamientos con los inhibidores, por lo que aunque el efecto de BFA y GCA parece alterar la asociación de VP7 con los viroplasmos, estas inclusiones permanecen de modo normal durante la infección. Posibilidad que requiere demostrarse.

Aunque los resultados anteriores pudieran indicar que la falta de trimerización de VP7 es el resultado de un mal plegamiento en esta proteína debido a una alteración en sus modificaciones post-traduccionales, no se puede excluir la posibilidad de que los inhibidores pudieran disminuir los niveles de Ca^{2+} en el lumen del RE, lo que pudiera provocar la inhibición en la trimerización de la proteína, ya que se ha reportado que el tratamiento de células infectadas con BFA puede inhibir el incremento en la permeabilidad de Ca^{2+} en la membrana plasmática así como el incremento en la toma de calcio hacia el interior del RE que se produce durante la infección de rotavirus (Ruiz *et al.* 2005).

En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que la disrupción del complejo COPI mediante inhibidores de la actividad del factor GBF1, provoca una disminución de la progenie viral infecciosa a través de bloquear el ensamblado de las proteínas de la capa externa del virus sobre las DLPs para formar las partículas de triple capa infecciosas, lo cual parece deberse a la inhibición de la trimerización de VP7.

Será importante en estudios posteriores determinar de manera más precisa la causa por la cual la VP7 no es capaz de trimerizar, así como identificar la vía intracelular (transporte retrógrado Golgi-ER o maduración de LDs) relevante para que ocurra esta trimerización.

VIII. CONCLUSIONES

- La inhibición de la actividad de COPI producida por BFA provoca la disminución de la infectividad de RRV. Sin embargo, GCA no altera la infectividad de este virus.
- Tanto BFA como GCA reducen la producción de más del 99% de la progenie viral infecciosa de rotavirus en células MA104.
- El efecto de BFA y GCA en el ciclo de replicación de rotavirus no se encuentra relacionado con los eventos de internalización del virus, ya que la adición de estos inhibidores a las 2 hpi reduce la progenie viral de forma similar a cuando se añaden al inicio de la infección.
- La disminución de la progenie viral provocada por BFA y GCA se mantiene solamente cuando los inhibidores son adicionados a las 4 hpi, antes del inicio del ensamble de las nuevas partículas virales.
- El tratamiento con BFA o GCA en células infectadas provoca una reducción en la movilidad electroforética de la proteína VP7.
- La presencia de BFA y GCA inhibe el ensamblado de partículas virales infecciosas de triple capa (TLPs), al bloquear la adquisición de las proteínas de capa externa VP7 y VP4.
- La disminución en la producción de progenie viral de rotavirus no está relacionada a una alteración en la glicosilación de VP7, ya que la cepa de SA11CL28 de rotavirus también demostró sensibilidad al tratamiento con BFA y GCA.
- La alteración en la movilidad de VP7 provocada por BFA y GCA no está relacionada a un cambio en el procesamiento de la glicosilación de esta proteína, puesto que estos tratamientos también inducen un cambio en la movilidad de la proteína VP7 no glicosilada de la variante SA11CL28.
- El tratamiento con BFA o GCA modifica la distribución intracelular de VP7 e impide su trimerización.

IX. PERSPECTIVAS

- Caracterizar los cambios en el procesamiento de VP7 (formación de puentes disulfuro, remoción del péptido señal, etc) durante los tratamientos con BFA y GCA que pudieran estar involucrados en el fenotipo observado.
- Determinar si la inhibición en la formación de trímeros de VP7 durante los tratamientos con BFA y GCA puede estar relacionada con una alteración (disminución) en los niveles de calcio en el lumen del RE.
- Evaluar si la presencia de los fármacos bloquea o no la gemación de las DLPs hacia el lumen del RE y la pérdida de la capa de lípidos de las partículas intermediarias.
- Analizar la ubicación intracelular de la proteína VP7 durante el tratamiento con BFA y GCA, mediante la evaluación de su co-localización con proteínas marcadoras del RE, el ERGIC y el aparato de Golgi.
- Definir cuál(es) de las funciones asignadas al complejo COPI/Arf1 (transporte retrogrado Golgi-RE o formación de LDs) se requiere para el ensamble de la capa externa de rotavirus.

X. REFERENCIAS

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2002). Intracellular vesicular traffic. En *Molecular biology of the cell. 5th edition* (págs. 749-809). Garland science, Taylor & Francis Group.
2. Aniento, F., Gu, F., Parton, R., y Gruenberg, J. (1996). An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. *J Cell Biol. Vol. 133*, 29-41.
3. Aoki, S., Settembre, E., Trask, S., Greenberg, H., Harrison, S., y Dormitzer, P. (2009). Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing fab. *Science. Vol. 324*, 1444-1447.
4. Au, K.-S., Chan, W.-K., Burns, J., y Estes, M. (1989). Receptor Activity of Rotavirus Nonstructural Glycoprotein NS28. *Journal of virology. Vol. 63*, 4553-4562.
5. Beck R., Ravet M., Wieland F.T. y Cassel D. (2009). The COPI system: Molecular mechanisms and function. *FEBS Letters, 583*, 2701–2709.
6. Beller, M., Sztalryd, C., Southall, N., Bell, M., Jäckle, H., Auld, D., y otros. (2008). COPI complex is a regulator of lipid homeostasis. *PLoS Biol. Vol. 25*.
7. Bergmann, C., Maass, D., Poruchynsky, M., Atkinson, P., y Bellamy, A. (1989). Topology of the non-structural rotavirus receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmic reticulum. *The EMBO journal. Vol.8*, 1695-1703.
8. Botelho, R., Hackam, D., Schreiber, A., y Grinstein, S. (2000). Role of COPI in phagosome maturation. *J Biol Chem. Vol. 275*, 15717-15727.
9. Chasey, D. (1977). Different particle types in tissue culture and intestinal epithelium infected with rotavirus. *J. gen. Virol. Vol. 37*, 443-451.
10. Cheung, W., Gill, M., Esposito, A., Kaminski, C., Courousse, N., Chwetzoff, S., y otros. (2010). Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in Viroplasms, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. *J. Virol. Vol. 84*, 6782–6798.

11. Cureton, D. K., Burdeinick-Kerr, R., y Whelan, S. P. (2012). Genetic inactivation of COPI coatomer separately inhibits vesicular stomatitis virus entry and gene expression. *J. Virol*, 86, 655–666.
12. Daro, E., Sheff, D., Gomez, M., Kreis, T., y Mellman, I. (1997). Inhibition of endosome function in CHO cells bearing a temperature-sensitive defect in the coatomer (COPI) component epsilon-COP. *J Cell Biol. Vol. 139*, 1747-1759.
13. Déctor, M., Romero, P., López, S., y Arias, C. (2002). Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO reports. Vol. 3*, 1175-1180.
14. Díaz-Salinas, M., Silva-Ayala, D., López, S., y Arias, C. (2014). Rotaviruses reach late endosomes and require the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor and the activity of cathepsin proteases to enter the cell. *J Virol. Vol. 8*, 4389-402.
15. Donaldson, J., y Jackson, C. (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *NATURE reviews Molecular cell biology. Vol. 12*, 362–375.
16. Dormitzer, P., Greenberg, H., y Harrison, S. (2000). Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium dependent trimers. *Virology. Vol. 277*, 420-428.
17. Duden, R., Griffiths, G., Frank, R., Argos, P., y Kreis, T. (1991). Beta-COP a 110 kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to beta-adaptin. *Cell. Vol. 64*, 649-665.
18. Ellong, E., Soni, K., Bui, Q., Sougrat, R., Golinelli-Cohen, M., y Jackson, C. (2011). Interaction between the triglyceride lipase ATGL and the Arf1 activator GBF1. *PLoS One. Vol. 6*.
19. Estes, M., y Greenberg, H. (2013). Rotaviruses. En D. Knipe, & P. Howley, *Fields of virology. 6a edición* (págs. 1347-1401). Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins.
20. Estes, M., Graham, D., Ramig, R., y Ericson, B. (1982). Heterogeneity in the structural glycoprotein (VP7) of simian rotavirus SA11. *Virology. Vol. 122*, 8-14.

21. Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F., y Burrone, O. (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *Journal of General Virology*. Vol. 80, 333–339.
22. Freeze, H. (1999). Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked oligosaccharides. En *Current protocols in molecular biology* (págs. 17.13A.1-17.13A.26). John Wiley & Sons, Inc.
23. Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A., y Ikehara, Y. (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *The journal of biological chemistry*, 263, 18545-18552.
24. Glick, B., y Luini, A. (2011). Models for Golgi traffic: A critical assessment. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Vol. 3.
25. González, R., Espinosa, R., Romero, P., López, S., y Arias, C. F. (2000). Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch Virol*, 145, 1963–1973.
26. Goueslain, L., Alsaleh, K., Roingeard, P., Descamps, V., Duverlie, G., Ciczora, Y., y otros. (2010). Identification of GBF1 as a cellular factor required for Hepatitis C virus RNA replication. *Journal of virology*. Vol. 84, 773–787.
27. Griffiths, G., Pepperkok, R., Locker, J., y Kreis, T. (1995). Immunocytochemical localization of β -COP to the ER-Golgi boundary and then TGN. *Journal of Cell Science*. Vol. 108, 2839-2856.
28. Gu, F., Aniento, F., Parton, R., y Gruenberg, J. (1997). Functional dissection of COP-I subunits in the biogenesis of multivesicular endosomes. *J Cell Biol*. Vol. 139, 1183-1195.
29. Guo, Y., Walther, T., Rao, M., Stuurman, N., Goshima, G., Terayama, K., y otros. (2008). Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature*. Vol. 453, 657-661.
30. Gutiérrez, M., Isa, P., Sánchez-San, M. C., Pérez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C. F. y López, S. (2010). Different rotavirus strains enter MA104 cells through

- different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.*, 84, 9161–9169.
31. Hobbie, L., Fisher, A., Lee, S., Flint, A., y Krieger, M. (1994). Isolation of three classes of conditional lethal Chinese hamster ovary cell mutants with temperature-dependent defects in low density lipoprotein receptor stability and intracellular membrane transport. *J. Biol. Chem. Vol. 269*, 20958–20970.
 32. Hsu, V. W. y Yang, J. (2009). Mechanisms of COPI vesicle formation. *FEBS Lett*, 583, 3758–3763.
 33. Kabacencell, A. K., y Atkinson, P. H. (1985). Processing of the rough endoplasmatic reticulum membrane glycoproteins of rotavirus SA11. *The journal of cell biology*, 101, 1270-1280.
 34. Kirchhausen, T. (2000). Three ways to make a vesicle. *Nature Reviews*, 1, 187-198.
 35. Klausner, R., Donaldson, J., y Lippincott-Schwartz, J. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol. Vol. 116*, 1071–1080.
 36. König, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H., Bhattacharyya, S., Miraglia, L., Ideker, T., García-Sastre, A., Young, J., Palese, P., Shaw, M. y Chanda, S. (2010). Human host factors required for Influenza virus replication. *Nature. Vol 463*, 813–817.
 37. Laemmli, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature. Vol. 227*, 680-685.
 38. Lay, D., Gorgas, K., y Just, W. (2006). Peroxisome biogenesis: where Arf and coatomer might be involved. *Biochim Biophys Acta. Vol. 1763*, 1678-1687.
 39. Legrand, C., Bour, J., Jacob, C., Capiamont, J., Martial, A., Marc, A., y otros. (1992). Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium. *J Biotechnol. Vol. 3*, 231-243.
 40. López, T., Camacho, M., Zayas, M., Nájera, R., Sánchez, R., Arias, C. F. y López, S. (2005). Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J. Virol. Vol. 79*, 184–192.

41. Maass, D., y Atkinson, P. (1990). Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. *Journal of virology*. Vol. 64, 2632-2641.
42. Maass, D., y Atkinson, P. (1994). Retention by the endoplasmic reticulum of rotavirus VP7 is controlled by three adjacent amino-terminal residues. *Journal of virology*. Vol. 68, 366-378.
43. Maruri-Avidal, L., López, S., y Arias, C. F. (2008). Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles. *J. Virol.*, 82, 5368–5380.
44. McLauchlan, J. (2009). Lipid droplets and hepatitis C virus infection. *Biochim Biophys Acta*. Vol. 1791, 552-559.
45. Mirazimi, A., Von Bonsdorff, C.-H., y Svensson, L. (1996). Effect of Brefeldin A on rotavirus assembly and oligosaccharide processing. *Virology*, 217, 554–563.
46. Mossessova, E., Corpina, R., y Jonathan, G. (2003). Crystal structure of ARF1-Sec7 complexed with Brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism. *Molecular Cell*. Vol. 12, 1403–1411.
47. Norkin, L., Anderson, H., Wolfrom, S. y Oppenheim, A. (2002). Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by Brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J Virol*. Vol. 76, 5156–5166.
48. Patton, J., Silvestri, L., Tortorici, M., Vasquez-Del Carpio, R., y Taraporewala, Z. (2006). Rotavirus Genome Replication and Morphogenesis: Role of the Viroplasm. En R. Polly, *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis* (págs. 169–187). Springer.
49. Pesavento, J., Crawford, S., Estes, M., y Venkataram Prasad, B. (2006). Rotavirus Proteins: Structure and Assembly. En R. Polly, *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis* (págs. 189–219). Springer.
50. Petrie, B., Graham, D., y Estes, M. (1981). Identification of rotavirus particle types. *Intervirology*. Vol. 16, 20-28.
51. Pol, A., Gross, S., y Parton, R. (2014). Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. *J. Cell Biol*. Vol. 204, 635–646.

52. Popoff, V., Adolf, F., Brügger, B., y Wieland, F. (2011). COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
53. Poruchynsky, M., Atkinson, P. (1991). Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *Journal of virology*. Vol. 65, 4720-4727.
54. Poruchynsky, M., Maass, D., y Atkinson, P. (1991). Calcium depletion blocks the maturation of rotavirus by altering the oligomerization of virus-encoded proteins in the ER. *The Journal of Cell Biology*. Vol 114, 651-661.
55. Rabouille, C., y Klumperman, J. (2005). The maturing role of COPI vesicles in intra-Golgi transport. *NATURE Reviews. Molecular cell biology*. Vol. 6, 812-817.
56. Razi, M., Chan, E., y Tooze, S. (2009). Early endosomes and endosomal coatomer are required for autophagy. *J Cell Biol*. Vol. 185, 305-321.
57. Ruiz, M., Díaz, Y., Peña, F., Aristimuño, O., Chemello, M., y Michelangeli, F. (2005). Ca²⁺ permeability of the plasma membrane induced by rotavirus infection in cultured cells is inhibited by tunicamycin and brefeldin A. *Virology*. Vol. 333, 54–65.
58. Sáenz, J. B., Sun, W. J., Chang, J., Li, J., Bursulaya, B., Gray, N. S., y otros. (2009). Golgicide A reveals essential roles for GBF1 in Golgi assembly and function. *Nature Chemical Biology*(5), 157-165.
59. Samsa, M., Mondotte, J., Iglesias, N., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A., y otros. (2009). Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog*. Vol. 5.
60. Sapin, C., Colard, O., Delmas, O., Tessier, C., Breton, Breton, M., y otros. (2002). Rafts promote assembly and atypical targeting of a nonenveloped virus, rotavirus, in Caco-2 cells. *J Virol*. Vol. 76, 4591–4602.
61. Schneider, C., Rasband, W., y Eliceiri, K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. Vol. 9, 671-675.
62. Shahrabadi, M., y Lee, P. (1986). Bovine rotavirus maturation is a calcium-dependent process. *Virology*. Vol. 152, 298-307.

63. Shahrabadi, M., Babiuk, L., y Lee, P. (1987). Further analysis of the role of calcium in rotavirus morphogenesis. *Virology*. Vol. 158, 103-111.
64. Silva-Ayala, D., López, T., Gutiérrez, M., Perrimon, N., López, S. y Arias, C. F. (2013). A genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *PNAS*.
65. Soler, C., Musalem, C., Loroño, M., y Espejo, R. (1982). Association of viral particles and viral proteins with membranes in SA11-infected cells. *Journal of virology*. Vol. 44, 983-992 .
66. Stirzaker, S., Whitfield, P., Christie, D., Bellamy, A., y Both, G. (1987). Processing of rotavirus glycoprotein VP7: Implications for the retention of the protein in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*. Vol. 105, 2897-2903.
67. Sun, E., He, J. y Zhuang, X. (2013). Dissecting the role of COP1 complexes in influenza virus infection. *J Virol*, 87, 2673-2685.
68. Suzuki, H., Konno, T., y Numazaki, Y. (1993). Electron microscopic evidence for budding process-independent assembly of double-shelled rotavirus particles during passage through endoplasmic reticulum membranes. *Journal of General Virology*. Vol. 74, 2015-2018.
69. Svensson, L., Dormitzer, P., Von Bonsdorff, C., Maunula, L., y Greenberg, H. (1994). Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly. *Journal of virology*. Vol. 68, 5204-5215.
70. Trask, S., McDonald, S. y Patton, J. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol*, 10, 165-177.
71. Verheije, M., Raaben, M., Mari, M., te Lintelo, E., Reggiori, F., van Kuppeveld, F., y otros. (2008). Mouse Hepatitis Coronavirus RNA replication depends on GBF1-mediated ARF1 activation. *PLoS Pathogens*. Vol. 4.
72. Walther, T., y Farese, R. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* Vol. 81, 687–714.
73. Whitney, J., Gomez, M., Sheff, D., Kreis, T., y Mellman, I. (1995). Cytoplasmic coat proteins involved in endosome function. *Cell*. Vol. 83, 703-713.

74. Wilfling, F., Thiam, A., Olarte, M.-J., Wang, J., Beck, R., Gould, T., y otros. (2014). Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting. *ELife*. 3(0):e01607