



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES QUE DEFINEN EL TROPISMO DE
ASTROVIRUS EN LÍNEAS CELULARES ESTABLECIDAS)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
LETICIA GUZMAN RUIZ

DR. CARLOS FEDERICO ARIAS ORTIZ
[IBT/UNAM](#)

DR. MARTIN GUSTAVO PEDRAZA ALVA
DR. JOSE LUIS PUENTE GARCIA
[IBT/UNAM](#)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., . Julio, 2019



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.



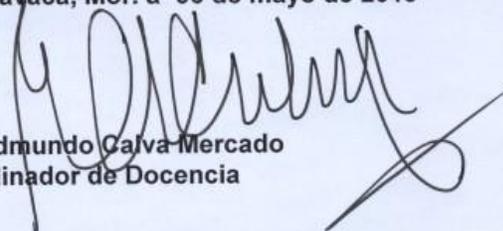
LETICIA GUZMAN RUIZ

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del día 06 de mayo del 2019 el Subcomité Académico acordó nombrar el siguiente jurado para Examen de Maestría en Ciencias, con **No. de cuenta 517031377** con la tesis titulada, **"Determinación de los factores que definen el tropismo de astrovirus en líneas celulares establecidas"** dirigido por el **Dr. Carlos Arias Ortiz**.

Presidente	Dr.	Baltazar Becerril Luján
Secretario	Dra.	Leonor Pérez Martínez
Vocal	Dr.	Fernando Roger Esquivel Guadarrama
Vocal	Dra.	Vanessa López Guerrero
Vocal	Dr.	José Luis Reyes Taboada

Sin más por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor. a 06 de mayo de 2019


Dr. Edmundo Galva Mercado
Coordinador de Docencia

En un plazo máximo de tres semanas, contados a partir del momento en que el sinodal designado oficialmente reciba la tesis, éste deberá dar su voto fundamentado por escrito, el cual será comunicado al comité académico. Si considera que le será imposible cumplir con esta obligación deberá indicarlo al alumno para ser sustituido de inmediato.



**Determinación de los factores que definen el tropismo
de astrovirus en líneas celulares establecidas
Por Leticia Guzmán Ruiz**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del Dr. Carlos Federico Arias Ortiz. Durante el proyecto se contó con soporte de la Unidad de Cómputo del IBT, a quienes se agradece su atención: Arturo Ocádiz Ramírez, Juan Manuel Hurtado Ramírez, Servando Aguirre Cruz, Roberto Pablo Rodríguez Bahena y David Santiago Castañeda Carreón. En la realización de la presente se contó con beca otorgada por CONACYT, además de apoyo por parte del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP).



Agradecimientos

A mis padres por apoyarme en todo momento.

A mis hermanos por poner toda su confianza en mí.

A mi asesor, el Dr. Carlos Arias por darme la oportunidad de aprender dentro su grupo de trabajo.

A mis mejores amigos, Paola Fernández, Mayra García y David Guevara, por estar presentes a pesar de la distancia física.

A Roberto Gonzáles, mi papá académico de licenciatura, amigo y quién me hizo contención emocional durante todos los días difíciles en el laboratorio y fuera de él, gracias por aguantar a esta mujer ansiosa.

A mis amigos de generación, Pau, David, Irenita y Yared, por apoyarme cuando me rompí la rodilla, por hacerme sentir aceptada en una nueva ciudad y una nueva universidad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de virología, en especial a Nayeli y Tomás por enseñarme a trabajar con astrovirus, a Joaquín y Sandoval por las buenas conversaciones y sus consejos siempre útiles, a Karloz y Cat, por escucharme y enseñarme que todos los días se puede aprender algo nuevo.



INDICE

Agradecimientos	4
Índice de figuras	7
Índice de tablas	8
Resumen	9
Introducción	11
Astrovirus de humanos - HAstV	13
Interacción de los astrovirus de humano con la barrera intestinal	14
Partícula viral y organización del genoma	16
Ciclo de replicación	20
Unión y entrada.....	20
Liberación del genoma	22
Traducción y replicación.....	24
Ensamble y salida del virión.....	26
Antecedentes.....	28
Hipótesis	30
Objetivo general.....	30
Objetivos particulares	30
Materiales y métodos	31
Células y virus	31
Determinación del título viral.....	31
Rendimiento viral	32
Ensayo de inmunofluorescencia.....	32
Concentración y purificación de partículas virales	33
Cinética de crecimiento de un solo ciclo	34
Extracción de RNA viral	34
Transcripción <i>in vitro</i> del plásmido pT7CFEG-Luc.....	34
Transfección	35
Detección de luciferasa	35
Clonación de células MA104	36



Resultados.....	37
Las células permisivas Caco-2 producen mayor cantidad de progenie viral de HAstV-1 y HAstV-8 que las células parcialmente permisivas MA104	37
A diferencia de las células Caco-2, solo una fracción de las células MA104 es permisiva a la infección. 39	
Solo un porcentaje de células MA104 es permisivo a la infección por astrovirus serotipos -1 y -8	44
El cultivo de células MA104 está conformado de distintas subpoblaciones en función de su permisividad hacia los astrovirus.....	45
La curva de crecimiento de un solo ciclo de HAstV-8 está retrasada en etapas tempranas de la infección en la línea celular MA104	47
En las células MDCKII y MA104 la infección por astrovirus está limitada tanto durante la entrada como en una etapa posterior a la liberación del RNA	51
Discusión.....	57
Conclusiones.....	63
Perspectivas.....	65
Referencias.....	66



Índice de figuras

Figura 1: Estructura con morfología de estrella visible por microscopía electrónica.....	11
Figura 2: Relaciones filogenéticas dentro de la familia Astroviridae	12
Figura 3: Diagrama del complejo de uniones apicales (Apical Junction Complex- AJC)	15
Figura 4: Modelo del virión maduro de HAstV-1	17
Figura 5: Estructura cristalográfica de las proteínas “core” y “spike” de HAstV-1.....	18
Figura 6: Organización genómica de los astrovirus.....	19
Figura 7: Proteínas no estructurales codificadas por los ORF1a y ORF1b.....	20
Figura 8: Ciclo replicativo de HAstV.....	23
Figura 9: Esquema del procesamiento proteolítico de VP90 de astrovirus	26
Figura 10: Estructura del virión de astrovirus por criomicroscopía y estructura cristalográfica	27
Figura 11: Mapa del plásmido pT7CFEG-Luc	35
Figura 12: La producción de partículas infecciosas es menor en células MA104 a las 18 hpi	38
Figura 13: El porcentaje de células Caco-2 infectadas aumenta conforme aumenta la MOI de HAstV-1 a las 18 hpi.....	40
Figura 14: El porcentaje de células Caco-2 infectadas aumenta de forma proporcional a la MOI en HAstV-1 (a) y HAstV-8 (b) a las 18 hpi	41
Figura 15: El patrón de células MA104 infectadas se comporta de manera distinta que el de la línea celular Caco-2 al ser infectadas a MOI creciente con HAstV-8 a las 18 hpi.....	432
Figura 16: El porcentaje de células MA104 infectadas con HAstV-8 es menor que en células Caco-2 a 18 hpi:	423
Figura 17: Solo un máximo de células MA104 pueden infectarse con HAstV-1 y -8.....	44
Figura 18: El porcentaje de infección de las clonas MA104 es hasta 10 veces menor que la línea celular parental	46
Figura 19: Las clonas obtenidas de MA104 infectadas con HAstV-8 se infectan menos que las células Caco-2 y la línea celular MA104 parental, 18 hpi	46
Figura 20: Curva de crecimiento de HAstV-8 en células Caco-2.....	48
Figura 21: Curva de crecimiento de HAstV-8 en células MA104	49
Figura 22: La curva de crecimiento de un solo ciclo de HAstV-8 está retrasada en células MA104.....	50
Figura 23: Las células Caco-2 muestran mejor eficiencia de transfección que las células MA104 y MDCKII..	52
Figura 24: La progenie viral infecciosa producida por la transfección de RNA viral es mayor en las células Caco-2.....	53
Figura 25: Detección de la proteína viral de la cápside en células MDCKII.....	54
Figura 26: El número de partículas infecciosas por célula transfectada es mayor en las células Caco-2	55



Índice de tablas

Tabla 1: Replicación de los astrovirus en múltiples líneas celulares.....	29
Tabla 2: Partículas infecciosas de HAstV producidas por diferentes líneas celulares a las 18 hpi.....	38
Tabla 3: Porcentaje de células infectadas a diferentes MOIs.....	43
Tabla 4: Curva de crecimiento de un solo ciclo de HAstV-8.....	48
Tabla 5: Cantidad de partículas infecciosas al transfectar RNA viral en diferentes líneas celulares.....	52



Resumen

Los astrovirus que infectan humanos son una causa importante de gastroenteritis en la población infantil. Se clasifican en 8 serotipos clásicos nombrados del 1 al 8 y algunos nuevos genotipos que genéticamente se parecen más a virus de animales que de humanos. El genoma de los astrovirus consiste de una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva, son virus no envueltos y la partícula viral está formada por el genoma viral rodeado por una cápside proteica icosaédrica de 35 nm.

Diferentes serotipos infectan con diferente eficiencia diferentes líneas celulares; la susceptibilidad o resistencia a la infección puede estar determinada a varios niveles del ciclo de replicación, tales como unión a la célula, la internalización de la partícula viral, la liberación del RNA viral (desnudamiento), la traducción del RNA, la replicación del genoma, el ensamble y salida de las partículas virales al exterior de la célula.

De acuerdo con evidencia previa, el objetivo de este trabajo consistió en determinar qué paso o pasos del ciclo de replicación de astrovirus determinan el tropismo en distintas líneas celulares. Se encontró que en una población de células de la línea celular Caco-2 infectadas con astrovirus serotipo 8, 95 % de las células en la monocapa pueden ser infectadas. En contraste, en la línea celular MA104, solo un aproximado de 13 % de las células pudieron infectarse. La clonación de subpoblaciones de células MA104, permitió identificar diversas clonas celulares que presentaron una susceptibilidad hasta 10 veces menor comparado con la línea celular parental.

Por otro lado, se estableció que en la línea celular Caco-2 se generan 143 y 328 partículas virales infecciosas por cada célula individual infectada para los serotipos 1 y 8 respectivamente; mientras que para la línea celular MA104 la producción fue de 34 y 24 respectivamente.



El crecimiento del virus en las líneas celulares Caco-2 y MA104 se determinó también a través una curva de crecimiento de un solo ciclo. En la línea celular MA104 se encontró un retardamiento de 3 h en la etapa inicial de la infección, y al comparar la curva de crecimiento de las células MA104 con la de las Caco-2, se observó también que la fase de explosión (“burst”) es de menor proporción en las células MA104.

Se estudió también la línea celular MDCKII, que es refractaria a la infección. Para determinar si el bloqueo está en la entrada, se introdujo el genoma viral por transfección, ya que el genoma puede traducirse directamente y empezar un nuevo ciclo de replicación. Al evadir la entrada, encontramos que las células MA104 y MDCKII producen una menor cantidad de progenie viral comparado con las células Caco-2.

Los resultados sugieren que para las líneas celulares MA104 y MDCKII la permisividad está limitada tanto durante la entrada, como en algún paso posterior del ciclo de replicación viral.



Introducción

Los astrovirus son agentes etiológicos de gastroenteritis viral con distribución mundial (Vu *et al.*, 2017). Fueron observados originalmente por Appleton y Higgins en 1975 como virus redondos pequeños en heces. Posteriormente, Mendeley y Cosgrove los nombraron astrovirus, que proviene de la palabra griega “astron”, debido a su morfología en forma de estrella vista por microscopía electrónica (Figura 1), sin embargo, esta estructura solo se logra observar en el 10 % de las partículas.

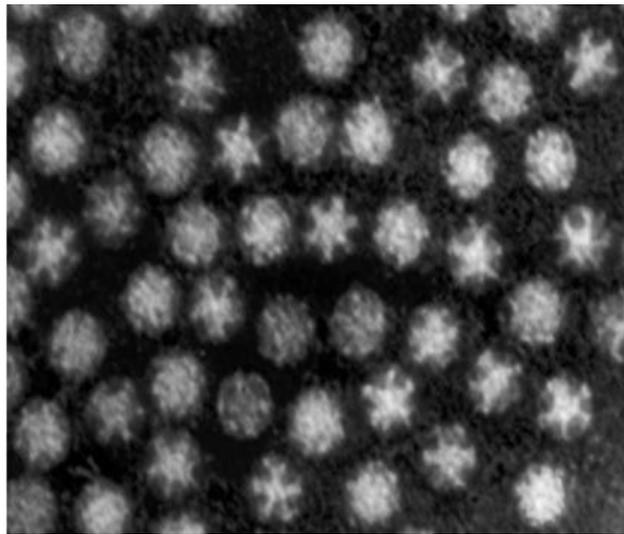


Figura 1: Estructura con morfología de estrella visible por microscopía electrónica. (Kang and Gray, 2013).

Inicialmente se creyó que los astrovirus pertenecían a las familias *Picornaviridae* o *Caliciviridae*, debido a la similitud de la organización genética de sus genomas; sin embargo, en 1993 se propuso una nueva familia para estos virus (Monroe *et al.*, 1993), lo cual fue aceptado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), clasificándolos en la familia *Astroviridae*.

La familia *Astroviridae* está formada por dos géneros, el género *Mamastrovirus*, que incluye virus que infectan mamíferos y el género *Avastrovirus* que comprende virus que infectan aves (Figura 2). Han sido aislados de una gran variedad de mamíferos y aves (humanos, gatos, ganado, perros, patos, ratones, puercos, ovejas, pavos, pollos, ratas, mamíferos marinos, etc.) y en la mayoría de los casos están asociados con



gastroenteritis en individuos jóvenes. En algunos casos pueden causar síndromes neurológicos y encefalitis, además han sido asociados con hepatitis fatal en patos, nefritis en palomas y algunos casos de enteritis y retraso del crecimiento en pollos (Hoshino *et al.*, 1981; Koci, Seal and Schultz-Cherry, 2000; Jonassen *et al.*, 2003; Rivera *et al.*, 2010; Martella *et al.*, 2011; Pantin-Jackwood *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2013).

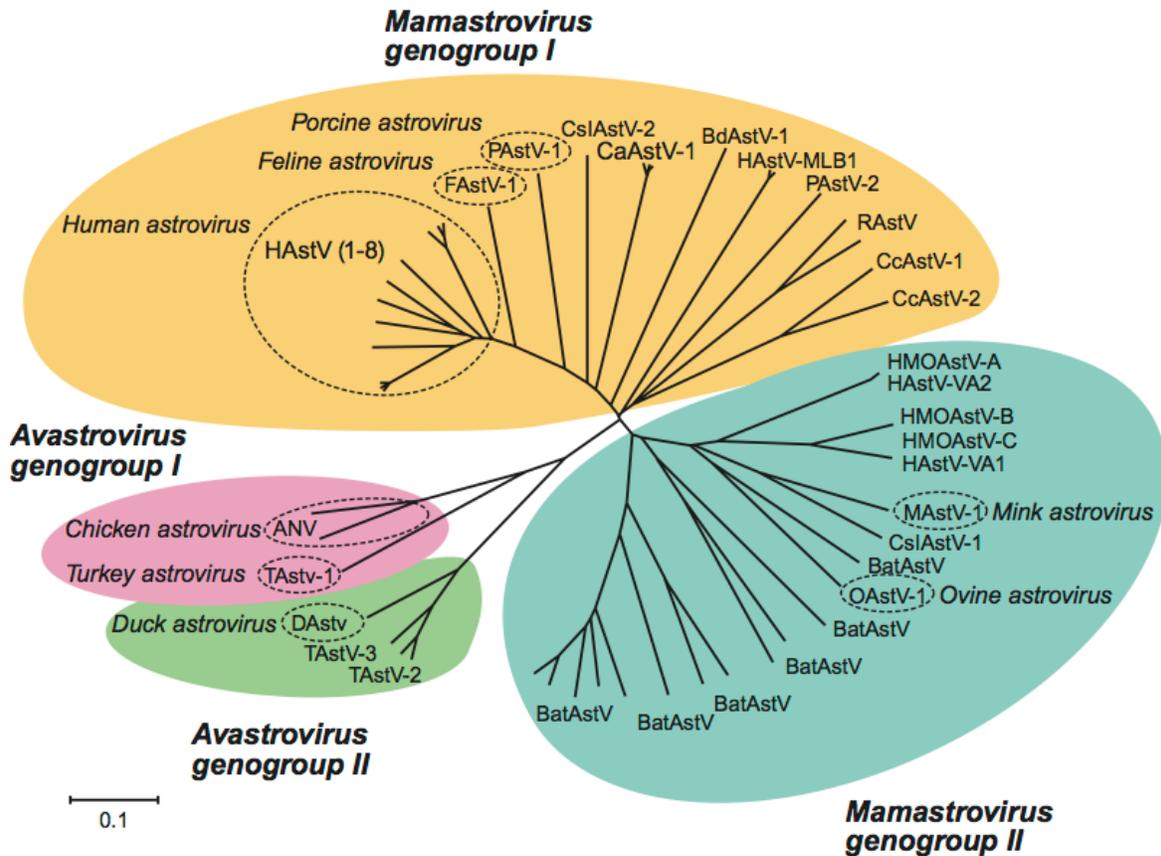


Figura 2: Relaciones filogenéticas dentro de la familia Astroviridae. Presenta dos géneros: Mamastrovirus y Avastrovirus. La clasificación de las especies de astrovirus está basada en la secuencia de aminoácidos del ORF2 (Méndez and Arias, 2013).



Astrovirus de humanos - HAstV

En humanos, hasta ahora se han identificado ocho serotipos clásicos (basados en ensayos de neutralización de la infectividad viral y más recientemente por análisis de la secuencia de aminoácidos de la mitad C-terminal -región variable- de la proteína de la cápside) nombrados del 1 al 8. Recientemente se han identificado dos nuevos grupos de astrovirus de humano (HAstV); el primero de ellos se identificó en un paciente pediátrico con gastroenteritis en Melbourne, Australia, por lo que se le nombró HAstV-MLB, y posteriormente se han identificado en niños en otras partes del mundo algunas otras cepas relacionadas. En 2009, un segundo grupo se descubrió en muestras de heces de niños en Virginia (llamado virus VA) y en Nigeria, Pakistan y Nepal (llamado virus HMO). Estos dos nuevos grupos de astrovirus son más parecidos genéticamente a astrovirus de animales que de humanos, lo que sugiere que emergieron por eventos zoonóticos (Finkbeiner, Kirkwood and Wang, 2008; Kapoor *et al.*, 2009; S. Finkbeiner *et al.*, 2009; Méndez and Arias, 2013; Bosch, Pintó and Guix, 2014).

Las enfermedades gastrointestinales son la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años a nivel mundial (Mirabelli and Wobus, 2018). Como se mencionó anteriormente, el HAstV se ha identificado como un agente etiológico causante de gastroenteritis con una distribución a nivel mundial y se estima es responsable del 2-9 % de los casos de diarrea aguda, no bacteriana en niños. Además, se han asociado a casos de encefalitis y meningitis en humanos, con frecuencia fatales (Johnson *et al.*, 2017; Vu *et al.*, 2017). Los serotipos clásicos son ubicuos, sin embargo, su presencia es más notoria en países en vías de desarrollo (Vu *et al.*, 2017). Recientemente, se reportó la epidemiología de HAstV en entornos comunitarios de 8 países de ingresos bajos y medios que muestran alta prevalencia de diarrea y desnutrición; la prevalencia de HAstV en muestras de diarrea fue de 5.6 % y de manera notable su severidad superó a todos los enteropatógenos que se detectaron, excepto rotavirus. En un estudio relacionado, se encontró que la mayor carga de diarrea en los primeros dos años de vida fue debida a infecciones por norovirus GII, rotavirus y astrovirus. Estos estudios muestran que HAstV es un causante de diarrea en niños alrededor del mundo, que suele ser ignorado, y realiza



la necesidad de su investigación futura así como el potencial de este virus como blanco para el desarrollo de una vacuna (Platts-Mills *et al.*, 2015; Olortegui *et al.*, 2018).

Mientras algunos serotipos se encuentran de manera constante, otros linajes parecen mostrar una rotación a lo largo del tiempo; por ejemplo, algunas cepas de HAstV-1 se han detectado por 10 años consecutivos en la misma área, mientras que otros re-emergen a distintos tiempos (Gabbay *et al.*, 2007; De Grazia *et al.*, 2016). Por otro lado, se estima que los HAstV son causa de aproximadamente 5 % de los casos de infecciones nosocomiales (Wang *et al.*, 2013; Xavier *et al.*, 2015).

Con respecto a la incidencia de los diferentes serotipos, HAstV-1 es por mucho el tipo más prevalente a nivel mundial, con ~50 % de los casos en recientes reportes, mientras que el segundo más frecuente difiere dependiendo de la zona geográfica y temporalidad (Vu *et al.*, 2017).

Interacción de los astrovirus de humano con la barrera intestinal

Se hipotetiza que los HAstVs incrementan la permeabilidad celular del epitelio intestinal al afectar la función de las uniones estrechas de las que depende el tracto intestinal para separar el lumen de la lámina basal. Al perderse o disminuir la integridad de las uniones estrechas, se altera el intercambio de iones y/o solutos e incrementa el movimiento de fluidos al lumen del intestino, reduciendo la habilidad del mismo de reabsorber agua y nutrientes, provocando diarrea (Johnson *et al.*, 2017).

La permeabilidad incrementada, regularmente resulta de una disrupción del citoesqueleto de actina o las proteínas de uniones estrechas. En efecto, luego de 24 h de infección por HAstV-1, el número de fibras de actina disminuye, al igual que la ocludina (Moser, Carter and Schultz-Cherry, 2007), componente esencial para la estabilización de uniones estrechas (Figura 3).

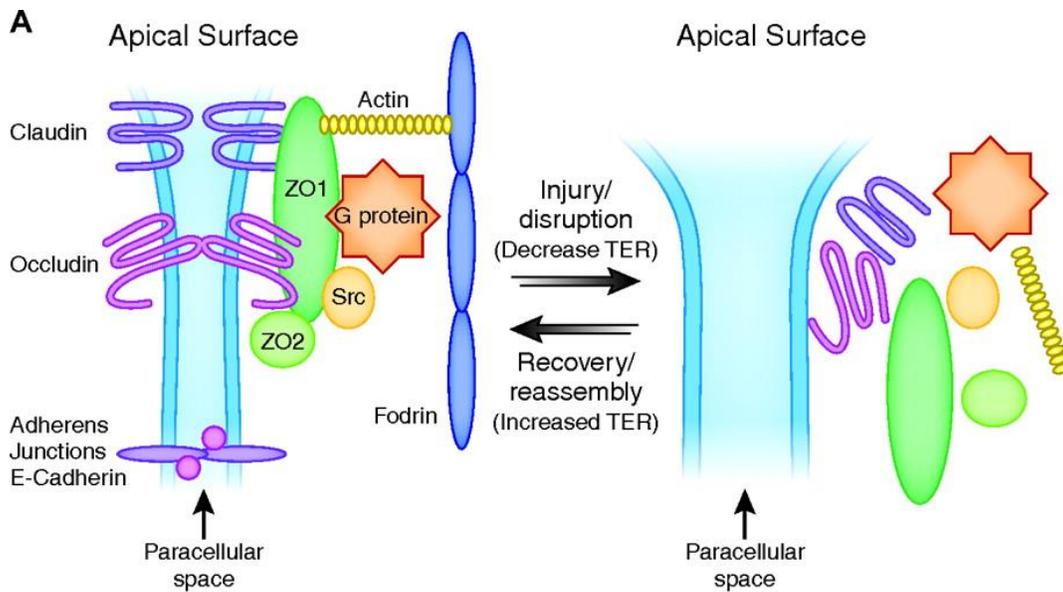


Figura 3: Diagrama del complejo de uniones apicales (Apical Junction Complex- AJC). La imagen muestra las uniones estrechas compuestas principalmente por las proteínas claudina, ocludina y zonula occludens (ZO) y las uniones adherentes, formadas por E-cadherina; ambas estructuras formadoras del complejo de uniones apicales, al ser modificadas, se incrementa el espacio paracelular y disminuye la resistencia eléctrica trans-epitelial (TER) (Denker and Sabath, 2011).

En el trabajo de Moser y col., se muestra que los ocho serotipos de HAstV incrementan la permeabilidad en la barrera epitelial en una infección apical en células Caco-2 (carcinoma de colon humano) polarizadas, a través de ensayos en los que midieron la resistencia eléctrica trans-epitelial (TER), la cual disminuye luego de la infección. Este decremento en la permeabilidad mostró ser dependiente de la multiplicidad de infección (MOI), a mayores concentraciones la TER en las monocapas disminuye más que las infectadas a MOI menores, y comparado con las células control no infectadas (Moser, Carter and Schultz-Cherry, 2007). Este incremento en la permeabilidad parece estar asociado a la unión del virus a las células epiteliales, pues ocurre aún con virus inactivado por UV y proteínas recombinantes de cápside purificadas, y por tanto de manera independiente a la replicación.



Hay dos teorías por las cuáles se explica el beneficio que obtiene el virus al incrementar la permeabilidad de la barrera epitelial. La primera es para incrementar la diseminación del virus en el organismo, pues romper las uniones estrechas permitiría a los virus entéricos moverse desde el lumen del intestino a los vasos sanguíneos y entonces al resto del cuerpo. La segunda, es que se exponga un receptor viral que se encuentra en la superficie basolateral o como parte de los complejos de proteínas de las uniones estrechas (Moser, Carter and Schultz-Cherry, 2007).

Partícula viral y organización del genoma

Las partículas de astrovirus están formadas por el genoma viral rodeado por una cápside icosaédrica con simetría T=3 y no están envueltas, esto es, no contienen una membrana de lípidos (Figura 4). Las partículas virales de HAstV se ensamblan a partir de una poliproteína precursora de las proteínas de la cápside, de 90 kDa (VP90). Esta poliproteína experimenta un proceso de maduración a través de cortes proteolíticos (ver adelante) y en la partícula inmadura exhibe 90 espículas o “spikes” diméricos globulares, mientras que la cápside madura presenta solo 30 “spikes” en su superficie; ésta pérdida de 60 “spikes” aparentemente tiene un papel importante en la infectividad viral, pues se sugiere que al eliminarse quedarían expuestos sitios de reconocimiento al receptor celular (Geigenmüller, Ginzton and Matsui, 2002; Méndez *et al.*, 2002).

La estructura de astrovirus se ha observado mediante crio-microscopía electrónica (cryo-EM) y cristalografía de alta resolución (Bass and Qiu, 2000; Dryden *et al.*, 2012; Toh *et al.*, 2016).

Con una resolución de 25 Å por cryo-EM, se elucidó la forma icosaédrica y la simetría T=3 de la partícula viral, además de su división en dos subdominios, núcleo o “core” interno y externo. Se observó también que las partículas maduras e inmaduras exhiben un diámetro de ~43 nm, de los cuales ~35 nm corresponden al “core” interno (Dryden *et al.*, 2012; York *et al.*, 2016).

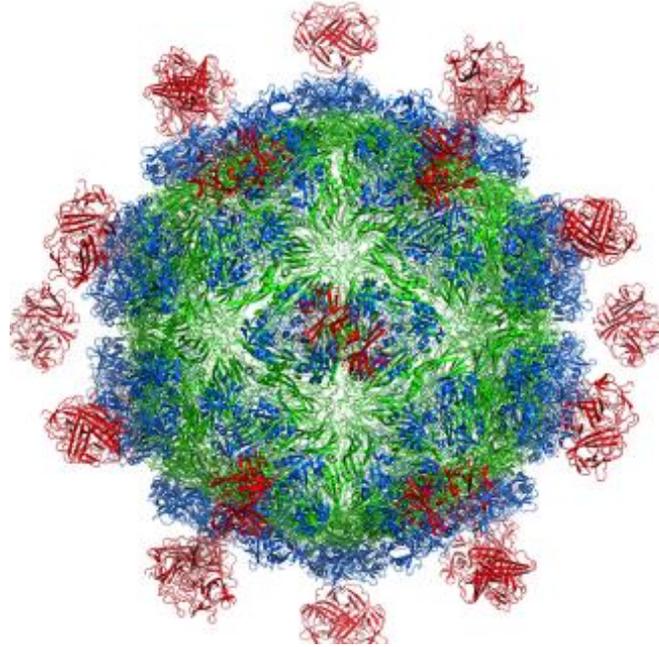


Figura 4: Modelo del virión maduro de HAstV-1. En rojo se muestran las proteínas de “spike” (VP27), en azul las proteínas del “core” externo y “core” interno en verde (York *et al.*, 2016).

Información sobre la estructura de las proteínas de la cápside obtenidas por cristalografía de rayos-x permitieron describir con más detalle las estructuras del “core” y “spike” a 2.15 y 1.8 Å, respectivamente. El “core” interno de la cápside es prácticamente el mismo en partículas maduras e inmaduras, mide ~35 nm y lo constituyen proteínas con un dominio típico de barril β tipo “jelly-roll” (Figura 5). El “core” externo está conformado por proteínas tipo barril β plegadas (Figura 5) y, a diferencia del “core” interno, éste cambia con la maduración de la partícula viral al ser digerido por tripsina; al final de la proteólisis, los fragmentos que resultan permanecen unidos por el extremo de la cadena β en el dominio de “core” (Toh *et al.*, 2016).

Los “spikes”, de 25 y 27 kDa (VP25 y VP27) se localizan en la superficie de la partícula viral en forma de dímero. Cada monómero se conforma por tres capas de láminas β en forma de sándwich; VP27 se encuentra antes del final de la cadena β del dominio de “core”, lo que probablemente le permite al “spike” mantenerse unido al “core”, en cambio, VP25 inicia luego del dominio de “core”, mediante una unión flexible, lo que sugiere que puede ser liberado del virión o está débilmente asociado a él luego de la digestión con tripsina (Dong *et al.*, 2011; Dryden *et al.*, 2012; Toh *et al.*, 2016; York *et al.*, 2016;



Bogdanoff *et al.*, 2017). Recientemente se reportó que los viriones infecciosos de HAstV-8 pueden estar formados por sólo dos proteínas: VP34 que forma el “core” y VP27 las espículas globulares diméricas del virus (Aguilar-Hernández, López and Arias, 2018).

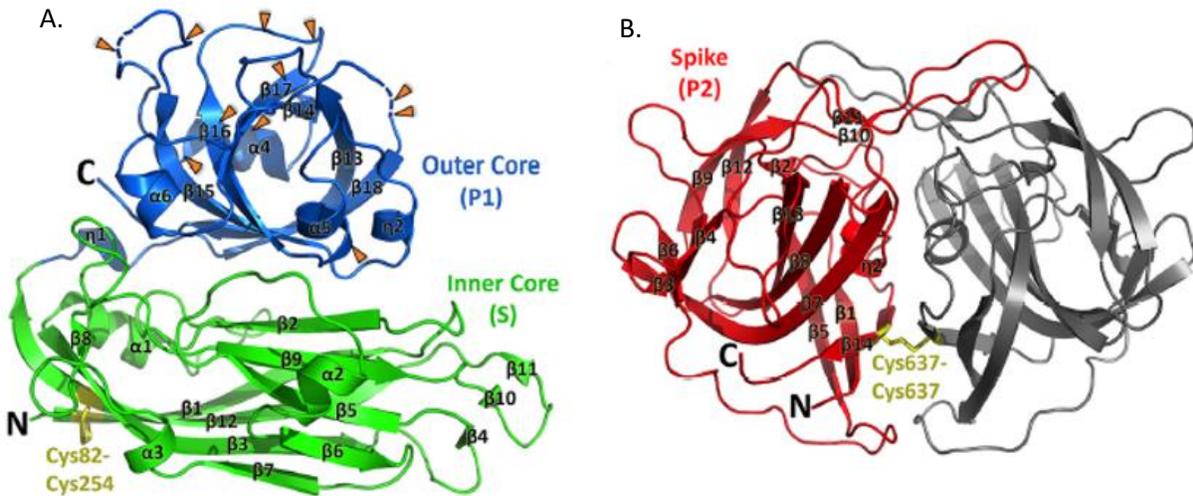


Figura 5: Estructura cristalográfica de las proteínas “core” y “spike” de HAstV-1. A) Proteína “core” VP34, en verde el “core” interno, en azul el “core” externo. B) Estructura cristalográfica de la proteína dimérica del dominio de “spike” VP27/VP25 de HAstV-1, los puentes disulfuro están marcados y coloreados de amarillo. (York *et al.*, 2016).

Por su parte, el genoma de los astrovirus está constituido por un RNA de cadena sencilla y polaridad positiva (Figura 6), con una longitud de aproximadamente 6.8 kb, excluyendo un trecho de poliA (“cola poliA”) en su extremo 3’. En el extremo 5’ tiene unida covalentemente una proteína llamada VPg (proteína viral ligada al genoma). El genoma viral contiene tres marcos de lectura abierta (ORF1a, ORF1b y ORF2) los cuales se encuentran sobrelapados, y están delimitados (flanqueados) por dos regiones no traducidas (Jiang *et al.*, 1993).

Los ORF1a y ORF1b codifican para proteínas no estructurales, involucradas en la transcripción y replicación del RNA, mientras que el ORF2 codifica para proteínas estructurales que se sintetizan a partir de un RNA subgenómico (Monroe *et al.*, 1993; Méndez and Arias, 2013; Bosch, Pintó and Guix, 2014).

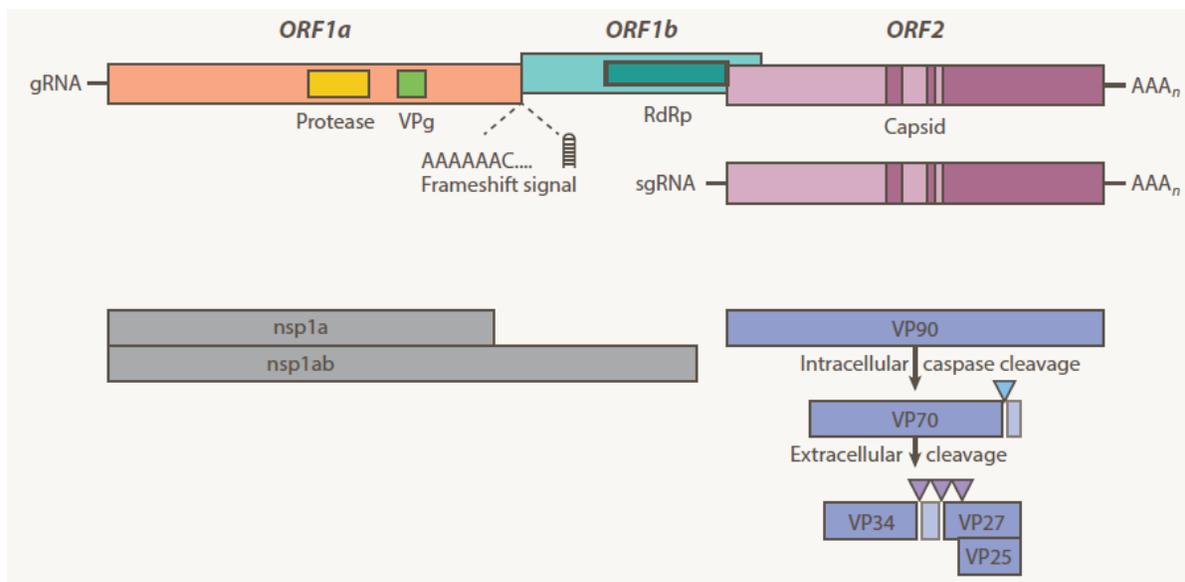


Figura 6: Organización genómica de los astrovirus. Tres marcos de lectura abierta (ORFs) que se superlapan codifican para proteínas estructurales y no estructurales. Las proteínas nsp1a y nsp1ab, traducidas a partir de los ORF1a y ORF1b, codifican para proteínas no estructurales que incluyen una proteasa, una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), una proteína viral ligada al genoma (VPg) y otras proteínas aún no caracterizadas. Las proteínas de la cápside (VP90), traducidas desde un RNA subgenómico procedente del ORF2, se procesan proteolíticamente por caspasas y tripsina extracelular hasta formar el virión maduro (Cortez *et al.*, 2017).

Los ORF1a y ORF1b se superlapan en 10-148 nt en el genoma de los astrovirus de mamíferos. Esta región contiene una señal esencial para la traducción de la RNA polimerasa viral (codificada en el ORF1b) a través de un mecanismo de cambio de marco de lectura (Jiang *et al.*, 1993; Marczinke *et al.*, 1994). La región no traducida del extremo 3' terminal contiene una estructura secundaria conservada nombrada como "stem-loop II motif", cuya función no ha sido determinada, pero se cree que mantiene la estabilidad de la estructura secundaria del RNA e interactúa con proteínas virales y celulares esenciales para la replicación (Jonassen, Jonassen and Grinde, 1998).

El ORF1a codifica para la poliproteína nsp1a (Figura 7), en la cual se han identificado 5-6 dominios transmembranales, seguidos por una región que codifica para una serinproteasa viral (v-Pro). También se ha identificado una región que codifica para una proteína viral ligada al genoma (VPg), codificada río abajo del dominio v-Pro (ver adelante) (Jonassen *et al.*, 2003; Fuentes *et al.*, 2012).



El ORF1b codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) del virus, que como se mencionó anteriormente, se traduce a partir de un mecanismo de cambio de marco de lectura (Jiang *et al.*, 1993; Marczinke *et al.*, 1994).

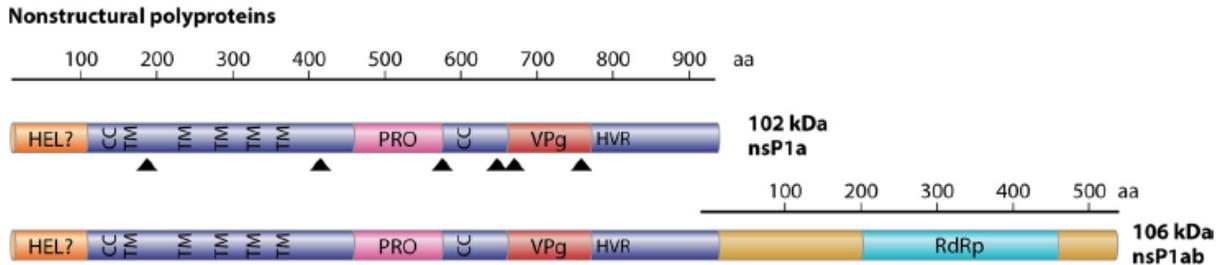


Figura 7: Proteínas no estructurales codificadas por los ORF1a y ORF1b. La poliproteína nsp1a y nsp1ab con distintos dominios: HEL: Dominio putativo de helicasa, CC: dominio coiled-coil, TM: dominio transmembrana, PRO: proteasa viral, VPg: proteína viral ligada al genoma, HVR: región hipervariable, RdRp: RNA polimerasa dependiente de RNA (Bosch, Pintó and Guix, 2014).

La región más variable del genoma está contenida en el ORF2, el cual codifica para la poliproteína VP90. La región N-terminal de esta poliproteína es más conservada que la C-terminal, y tiene una composición rica en arginina y lisina con un rol crucial para la interacción de la proteína de cápside con el RNA genómico (Geigenmüller, Ginzton and Matsui, 2002). La región C-terminal es más variable y determina los serotipos de HAstV. Esta región es la que forma las espículas del virión, mientras que la más conservada forma el “core” de la cápside (Figura 4) (Krishna, 2005).

Ciclo de replicación

El ciclo de replicación de astrovirus (Figura 8) no se conoce por completo, aunque hay diversas etapas que no han sido bien caracterizadas. A continuación, se presentan datos relevantes acerca de este proceso.

Unión y entrada

La replicación de astrovirus comienza con la unión del virus a la célula. No se ha identificado el receptor celular y los diferentes serotipos presentan diferente tropismo (Brinker, Blacklow and Herrmann, 2000), lo que podría indicar diferentes restricciones específicas de la célula.



Las proteínas de “spike” en la cápside contienen motivos estructurales conservados que al ser bloqueados neutralizan la infectividad del virus, probablemente por una interrupción de la unión del virus a la superficie de la célula, lo que sugiere que son éstos dominios los involucrados en la asociación del virus a la célula (Sanchez-Fauquier *et al.*, 1994; Bass and Upadhyayula, 1997; Bogdanoff *et al.*, 2017). Al estudiar la estructura cristalográfica del “spike” de los 8 serotipos clásicos, se encontró una composición de residuos aminoacídicos polares conservada en los 8 serotipos, característica de reconocimiento de receptores oligosacáridos (Dong *et al.*, 2011), sin embargo no se ha determinado de manera concluyente que el receptor celular esté formado por oligosacáridos. Se han probado diversos policasáridos, tales como heparina, heparan sulfato y dextran sulfato, mostrando solo un bloqueo parcial en la infección por HAstV-8, la adición de glicoporina (una proteína rica en ácido siálico) no tuvo efecto en la infectividad, sugiriendo que una molécula diferente a ácido siálico puede funcionar como receptor celular (Dong *et al.*, 2011).

Por microscopía electrónica, se logró observar que los astrovirus pueden unirse en cualquier región de la membrana plasmática de células Graham 293 (riñón de embrión humano), pero se adsorben preferencialmente en extensiones de la célula (con estructura como de pseudópodos) y 10 min después de la unión, se pudo observar a las partículas dentro de vesículas recubiertas en la periferia del citoplasma (Donelli *et al.*, 1992).

Estudios más recientes, demuestran que el tiempo promedio para la unión del virus a la superficie celular es de 10 min, y que empleando drogas bloqueadoras del ensamble de clatrina (cloropromazina y dansilcadaverina), integridad del citoesqueleto (citocalasina D y jaspakinolido) y acidificación del endosoma (bafilomicina A1), se inhibe la infectividad de astrovirus en células Caco-2; resultados que sugieren una ruta de entrada endocítica mediada por clatrina, dependiente del citoesqueleto de actina y la acidificación de endosomas (Méndez *et al.*, 2014).



Para confirmar que clatrina está involucrada en la entrada de HAstV, se silenció la expresión de la cadena pesada de clatrina empleando un RNA interferente y sobre-expresando mutantes dominantes negativos de dinamina 2 (GTPasa que participa en la escisión de los endosomas de la membrana celular) y Eps15 (adaptador de proteínas que interactúan con clatrina durante la endocitosis); en los tres casos se observó una reducción de la infectividad de HAstV-8 (Méndez *et al.*, 2014).

Además, se sabe que la interacción de HAstV con la célula hospedera provoca la activación de la ruta de señalización de proteín-quinasas activadas por mitógenos (ERK1/2), y la inhibición de su activación reduce significativamente la producción viral, afectando todas las etapas del ciclo viral, tanto la expresión temprana y tardía de proteínas como la transcripción de RNA genómico y subgenómico; esto podría deberse a una regulación directa, en la que ERK fosforile la RdRp para activarla o estabilizarla, como sucede en coxsackievirus B3, o indirecta, en que ERK 1/2 permita la activación de diversos factores de transcripción importantes para la replicación viral (Moser and Schultz-Cherry, 2008).

Liberación del genoma

Una vez que el virus entra a la célula, el RNA es liberado al citoplasma; no se conoce el sitio ni los factores virales o celulares implicados, pero se ha estimado que el tiempo medio para la liberación del RNA es de 130 min (Méndez *et al.*, 2014). Al silenciar mediante RNA de interferencia la expresión de Rab7, una GTPasa pequeña involucrada en el proceso de tráfico vesicular (incluyendo la maduración de endosomas tempranos a endosomas tardíos), se redujo la infectividad alrededor de 50 %, lo que sugiere que las partículas virales necesitan llegar a endosomas tardíos para liberar sus genomas (Méndez *et al.*, 2014).

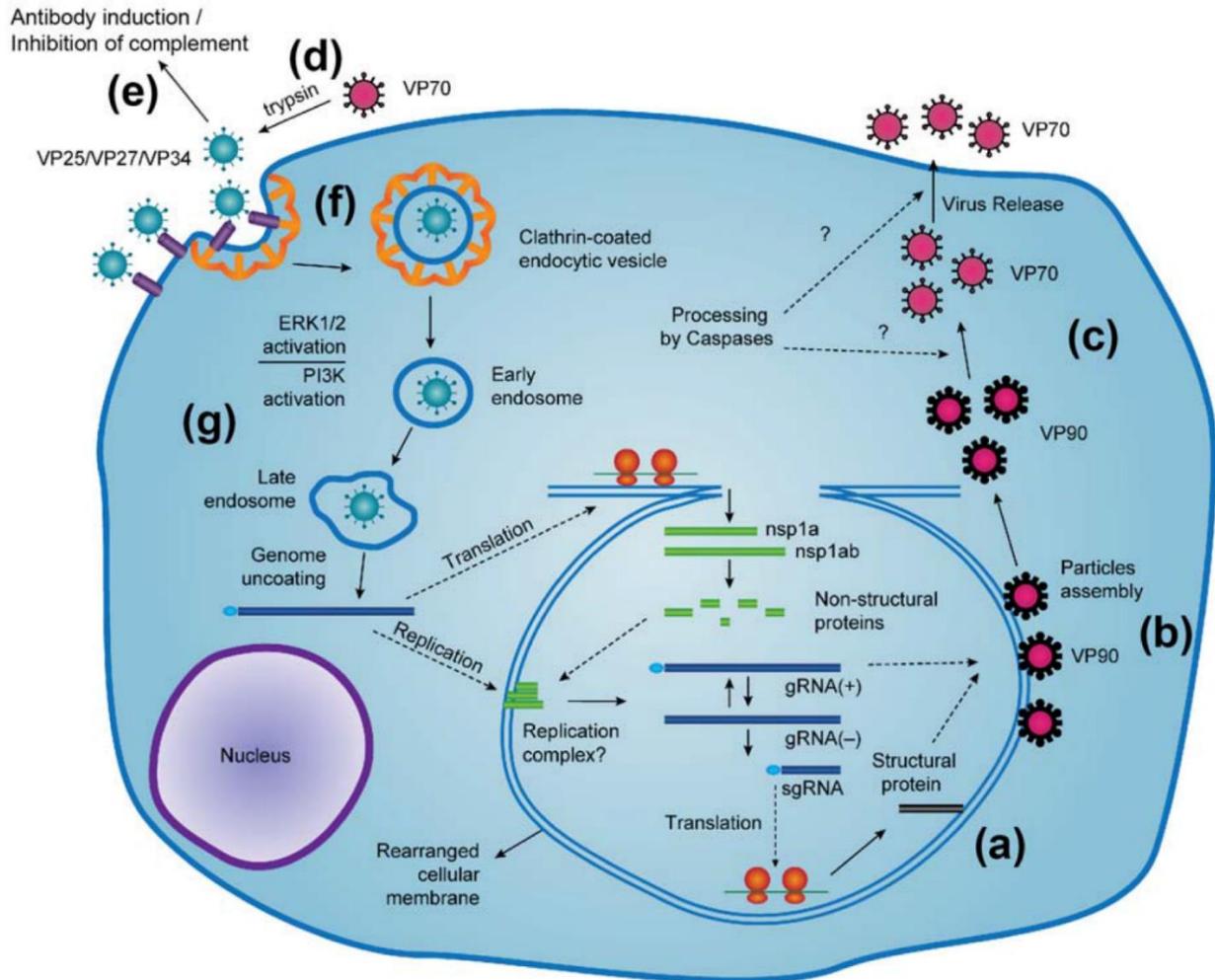


Figura 8: Ciclo replicativo de HAstV. a) Síntesis de la proteína de cápside VP90 Desde un RNA subgenómico, b) ensamble de las proteínas VP90 con RNA viral en partículas virales, c) Procesamiento proteolítico por caspasas celulares y la subsecuente formación de partículas inmaduras con VP70 que se liberan de la célula, d) Procesamiento proteolítico por tripsina extracelular, para formar partículas maduras, e) Partículas extracelulares de HAstV inducen la producción de anticuerpos del hospedero y éstos inhiben la activación del complemento, f) Unión y endocitosis dependiente de clatrina, g) Liberación del genoma viral en endosomas tardíos (Arias and Dubois, 2017).

Hay evidencia de que la liberación del RNA es un proceso asociado a membranas, entre las que puede estar la membrana del retículo endoplásmico, que hace las veces de diana del dominio C-terminal de la proteína de cápside (Méndez *et al.*, 2007).



Traducción y replicación

Una vez dentro de la célula, el RNA es usado como templado para traducir las poliproteínas no estructurales nsp1a y nsp1b. Al menos 4 sitios de corte se han sugerido dentro de la poliproteína nsp1a, por tanto, se pueden generar al menos 4 productos nsp1a/1, nsp1a/2, nsp1a/3 (proteasa) y nsp1a/4 (Geigenmüller *et al.*, 2002; Kiang and Matsui, 2002; Méndez *et al.*, 2003; Guix *et al.*, 2005; Fuentes *et al.*, 2011).

Nsp1a/3, codifica una serín proteasa con propiedades típicas de enzimas, como tripsina; ensayos de actividad hidrolítica indican que reconoce Glu y Asp específicamente como sustratos en el sitio de corte (Speroni *et al.*, 2009). Nsp1a/4, co-localiza con el retículo endoplásmico y el RNA viral y tiene descritos diversos dominios: dos regiones “coiled-coil”, una que coincide con un dominio de muerte (DD), una de localización nuclear (NLS), una para una proteína viral ligada al genoma (VPg) y una región hipervariable (HVR) (Guix *et al.*, 2004; Fuentes *et al.*, 2011; Méndez and Arias, 2013), lo que sugiere que está involucrada en diversas funciones, entre ellas la inducción de apoptosis para activar las caspasas necesarias para la maduración de la partícula viral (ver adelante) y la regulación de la replicación de RNA (Guix *et al.*, 2005). Además, mediante estudios *in-vitro*, con la proteína nsp1a/4 clonada en un sistema de baculovirus, se identificaron diversas isoformas que pueden o no estar fosforiladas, se observó que se acumulan en forma de oligómeros y que si se co-expresa con la RNA polimerasa dependiente de RNA, éstas interactúan formando heterodímeros (Fuentes *et al.*, 2011). En un estudio más reciente, Cristina Fuentes y col., identificaron una proteína ligada al genoma viral (VPg) unida covalentemente al extremo 5' terminal del genoma, a través de un enlace fosfodiéster, esencial para la infectividad del virus pues hay evidencia de que está involucrada en procesos como la replicación, transcripción y traducción (Fuentes *et al.*, 2012). La función de los demás productos no ha sido bien caracterizada y permanece sin conocerse.



Como se mencionó, la traducción de RdRp ocurre a través de un mecanismo de cambio de marco ribosomal -1 en la región sobrelapada entre ORF1a y ORF1b; esta señal tiene dos componentes esenciales, una secuencia heptamérica (A₆C) y una estructura tallo-bucle en el RNA (Jiang *et al.*, 1993; Marczinke *et al.*, 1994). La proteína obtenida, nsp1ab, es procesada co-traduccionalmente en el amino terminal para formar la proteína nsp1b, se sugiere que dicho procesamiento es realizado por una proteasa celular, independiente de la actividad de v-Pro (Geigenmüller *et al.*, 2002; Méndez *et al.*, 2003).

Una vez sintetizadas las proteínas no estructurales del virus (NSP), éstas funcionan para replicar el RNA viral. El ciclo de replicación del genoma de astrovirus no ha sido caracterizado a detalle, pero las características generales se pueden inferir a partir de otros virus con cadena de RNA sencillo de polaridad positiva (Geigenmüller, Méndez and Matsui, 2003). Así, a partir del RNA genómico se sintetiza un RNA complementario, de sentido negativo, llamado también antigenómico, que es usado a su vez como molde para producir copias del RNA genómico, de polaridad positiva y también para sintetizar RNA subgenómico, de polaridad positiva (Méndez and Arias, 2013; Bosch, Pintó and Guix, 2014).

Las proteínas de cápside se sintetizan desde un RNA subgenómico viral que se traduce en una proteína de 72-90 kDa (Monroe *et al.*, 1993; Méndez *et al.*, 2002; Dryden *et al.*, 2012). Como se mencionó anteriormente, el N-terminal de la proteína de la cápside es conservado en la mayoría de los astrovirus, mientras que la mitad C-terminal muestra una alta variabilidad (Geigenmüller, Ginzton and Matsui, 2002).

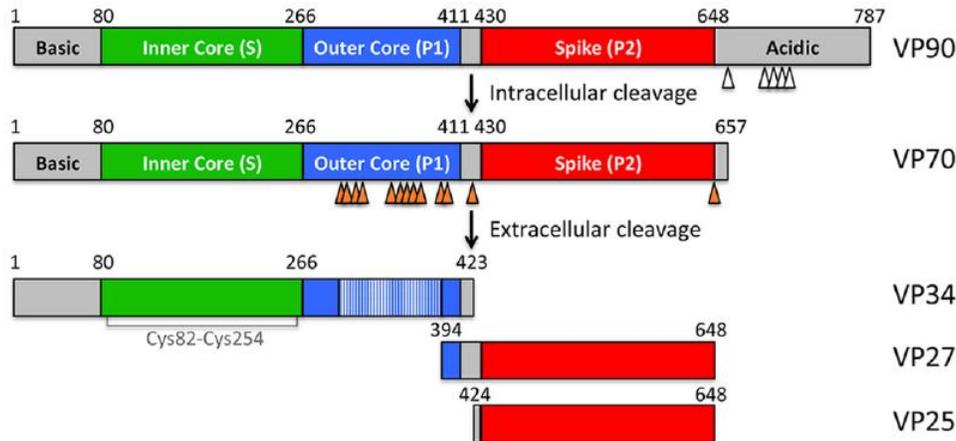


Figura 9: Esquema del procesamiento proteolítico de VP90 de astrovirus. Se muestra el procesamiento proteolítico de la proteína VP90, traducida desde RNA subgenómico proveniente del ORF2, se señalan los sitios de corte por caspasas (flechas naranjas) y por tripsina (flechas blancas), para producir a las proteínas del virus infeccioso VP34, VP27 y VP25 (York *et al.*, 2016).

Ensamble y salida del virión

La proteína de cápside de 90 kDa (VP90) se ensambla en partículas virales; se sugiere que dicho ensamble ocurre en estructuras membranosas (Geigenmüller *et al.*, 2002; Méndez *et al.*, 2007). Intracelularmente, las caspasas cortan VP90 en el dominio ácido C-terminal (Figura 9), para generar VP70; 180 copias de esta proteína forman un virión inmaduro (Méndez, Salas-Ocampo and Arias, 2004). Las caspasas involucradas en el procesamiento de VP90 son la 3 y la 9 (Banos-Lara and Méndez, 2010). El procesamiento de VP90 a VP70 no es requerido para el ensamble de las partículas, sin embargo, es importante para que el virus pueda salir de la célula infectada; inhibición de la actividad de caspasas reduce drásticamente la liberación de las partículas virales (Méndez, Salas-Ocampo and Arias, 2004; Méndez *et al.*, 2007; Banos-Lara and Méndez, 2010).

El mecanismo por el cual se liberan las partículas virales inmaduras no se conoce, se sugiere que ocurre por un mecanismo no-lítico a través de vesículas autofágicas o alguna forma de desestabilización de la membrana celular (Ernesto *et al.*, 2012; Arias and Dubois, 2017).



Una vez fuera de la célula, la partícula formada por VP70 aún es inmadura y es necesario su procesamiento por tripsina para generar partículas infecciosas (Figura 10); el procesamiento de VP70 resulta en la formación de tres polipéptidos finales (Figura 9): VP34, VP27 y VP25 (Méndez *et al.*, 2002). VP34 (de aproximadamente 34 kDa) es derivada del dominio N-terminal conservado de VP90 que conformará la cápside. VP27 y VP25 (de 27 kDa y 25 kDa respectivamente), provienen de la región hipervariable, son coterminales en su extremo carboxilo, tienen un N-terminal diferente, y forman los “spikes” de la superficie de la cápside (Dong *et al.*, 2011).

En cultivo celular, la maduración de astrovirus por proteólisis con tripsina, mejora la infectividad viral en el orden de 10^5 veces (Méndez *et al.*, 2002).

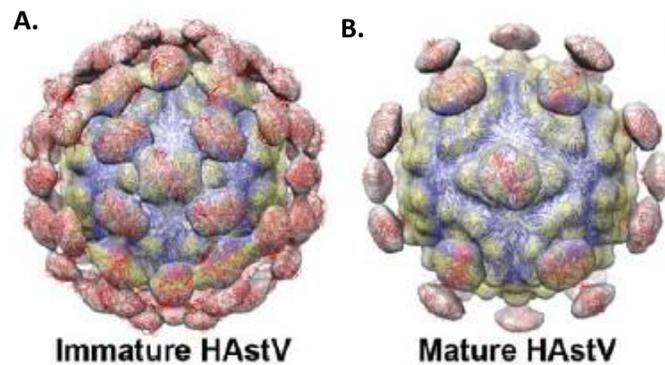


Figura 10: Estructura del virión de astrovirus por criomicroscopía y estructura cristalográfica. A) Modelo de la partícula inmadura de HAsTV visto por criomicroscopía. B) Modelo de la partícula madura (digerida por tripsina) de HAsTV visto por criomicroscopía. (Arias and Dubois, 2017).



Antecedentes

Los astrovirus tienen, en general, un marcado rango de hospederos y de restricción de edad. Los aislados de astrovirus usualmente causan enfermedad sólo en las especies de donde se obtuvieron y los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos. Poco se sabe acerca del tropismo celular y tisular de astrovirus en humanos, aunque para los ocho serotipos clásicos se considera que la infección está limitada a enterocitos del intestino delgado.

Las bases moleculares de este tropismo se desconocen. Esto se debe en parte al hecho de que los estudios genéticos de HAstV han estado limitados por la falta de un sistema de estudio eficiente. Por ejemplo, la línea celular Caco-2, pese a ser considerada la mejor para aislar HAstV de muestras fecales y ser permisiva para los diferentes serotipos, posee baja transfectabilidad, mientras que las células BHK-21 (riñón de hámster Sirio recién nacido), a pesar de ser altamente transfectables, son escasamente permisivas (Brinker, Blacklow and Herrmann, 2000; Velázquez-Moctezuma *et al.*, 2011).

A nivel celular, la permisividad o resistencia a la infección puede estar determinada a varios niveles del ciclo de replicación, tales como la unión del virus a la superficie celular, la internalización de la partícula viral, el desnudamiento del RNA viral, la traducción del genoma viral, la replicación del genoma y el ensamble y salida de las partículas virales.

In vivo, el tropismo celular de los virus es un determinante importante en la patogénesis de las enfermedades virales; la comprensión de las bases que restringen el crecimiento del virus en células no permisivas puede ayudar a caracterizar las estrategias de replicación del virus así como funciones biológicas del huésped. Este conocimiento puede ser útil para diseñar estrategias de prevención y tratamiento de la enfermedad.

Los diferentes serotipos de astrovirus de humanos muestran diferencias en su capacidad para infectar diferentes líneas celulares en cultivo (Tabla1), aunque en general infectan células derivadas de humanos y simios, pero no de mamíferos diferentes a primates (Brinker, Blacklow and Herrmann, 2000).



Cell line	Cell origin	AV1	AV2	AV3	AV4	AV5	AV6	AV7
Caco-2	Human colon adenocarcinoma	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
T84	Human colon carcinoma	+++	+++	++	+	+	+	+
HT-29	Human colon adenocarcinoma	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
HCT-15	Human colon adenocarcinoma	+	0	0	0	0	0	0
SK-CO-1	Human colon adenocarcinoma	+++	+++	++	+++	+++	++	0
Hu Tu 80	Human duodenum adenocarcinoma	++	0	0	0	0	0	0
HeLa 229	Human cervix epitheloid carcinoma	++	++	0	0	0	++	0
HEp-2 ^a	Human larynx epidermoid carcinoma	++	++	0	++	+	0	++
KB ^a	Human oral epidermoid carcinoma	++	++	0	0	0	0	0
293 ^b	Human embryonic kidney	++	++	0	++	++	++	++
RD	Human muscle rhabdosarcoma	++	++	0	0	++	++	0
PLC/PRF/5	Human liver hepatoma	+++	+++	+	+	+	+	0
MRC-5 ^e	Human lung diploid fibroblast	+	0	0	0	0	0	+
A549	Human lung carcinoma	+++	+++	0	+++	+	0	0
SF ^e	Human foreskin diploid fibroblast	0	0	0	0	0	0	0
MA-104 ^c	African green monkey fetal kidney	+++	++++	+++	+	++	++	++
COS-1 ^d	African green monkey kidney	+++	+++	0	+++	+++	+++	0
VERO	African green monkey kidney	+++	++++	+++	+++	+++	+++	0
BGMK	Buffalo green monkey kidney	++	++	0	0	+	++	0
LLC-MK2	Rhesus monkey kidney	++	++	0	+	++	++	0
FRhK-4	Rhesus monkey fetal kidney	0	++	0	++	++	0	0
P RMK ^e	Rhesus monkey primary kidney	+	++	0	0	++	++	0
P RK ^e	Rabbit primary kidney	0	0	0	0	0	0	0
MDBK	Bovine kidney	+ ^f	0	+ ^f	0	0	0	0
MDCK	Canine kidney	0	0	0	0	0	0	0
Sp1 K	Dolphin kidney	0	0	0	0	0	0	0
BHK-21(C13)	Syrian hamster newborn kidney	0	+	0	0	0	0	0
CHO K1 ^d	Chinese hamster ovary	+ ^f	+ ^f	0	0	0	0	0
P SHK	Syrian hamster primary kidney	0	0	0	0	0	0	0
L(C929)	Mouse connective tissue	0	0	0	0	0	0	0
BALB/3T3	Mouse embryo	+ ^f	0	0	0	0	0	0
P BALB/c K	Mouse primary kidney	0	+ ^f	0	0	0	0	0

Tabla 1: Replicación de los astrovirus en múltiples líneas celulares (Brinker, Blacklow and Herrmann, 2000). Título relativo de astrovirus determinado por ELISA. 0= Elisa negativo en muestras no diluidas. +=ELISA positivo solo en la muestra no diluida. +=ELISA positivo en muestras diluidas 1×10^{-1} . +++=ELISA positivo en muestras diluidas 1×10^{-2} . ++++=ELISA positivo en muestras diluidas 1×10^{-3} .

Aguilar-Hernández, 2018, en su tesis de maestría, encontró que los HAsTV de serotipo 1, 2 y 8 infectan a células Caco-2, con una eficiencia mayor que a células MA104 y Vero, de epitelio de riñón de mono verde; también encontró que células epiteliales de riñón de perro, MDCKII, son refractarias a la infección por estos tres virus.

En este proyecto proponemos identificar el(los) paso(s) del ciclo de replicación de astrovirus de humano serotipos 1 y 8 (HAsTV-1 y -8) que restringe(n) su tropismo en líneas celulares establecidas.



Hipótesis

Los HAstV-1 y -8 presentan tropismo celular asociado a etapas específicas de su ciclo de replicación hacia líneas celulares establecidas, las cuales pueden ser permisivas, parcialmente permisivas o no permisivas.

Objetivo general

Caracterizar los pasos del ciclo de replicación de astrovirus humano serotipos 1 y 8 (HAstV-1 y HAstV-8) que determinan su tropismo en líneas celulares establecidas.

Objetivos particulares

1. Determinar la infectividad y producción de progenie viral de HAstV-1 y HAstV-8 en células permisivas (Caco-2) y parcialmente permisivas (MA104).
2. Determinar la curva de crecimiento de HAstV-8 en células Caco-2 y MA104.
3. Identificar el paso del ciclo de replicación que limita el crecimiento en células parcialmente permisivas (MA104) y no permisivas (MDCKII).



Materiales y métodos

Células y virus

La línea celular Caco-2 (células de adenocarcinoma de humano), clona C2Bbe1, se creció bajo una atmósfera de 10 % de CO₂, a 37 °C, en medio DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle Medium – High Glucose) suplementado con 15 % de suero bovino fetal, aminoácidos no esenciales y en una solución amortiguadora. Las líneas celulares MA104 (Provenientes de riñón de mono verde) y MDCKII (células epiteliales de riñón de perro), se crecieron en medio Advanced DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-Thermo Scientific), en un ambiente con 5 % de CO₂ a 37 °C.

Las cepas de HAstV serotipos 1 y 8 se propagaron en células Caco-2, durante este trabajo se emplearán de manera indistinta los términos HAstV-8 y Yuc-8 para referirse a astrovirus serotipo 8. Para ello, se infectó una monocapa con el virus seleccionado (serotipo 1 u 8): el virus se activó con 200 µg/mL de tripsina a 37 °C durante 1 h, en un ambiente con 5 % de CO₂. Posteriormente se añadió la misma concentración (200 µg/mL) de inhibidor de tripsina (Sigma) al lisado viral y se adicionó a las células Caco-2 durante 1 h a 37 °C y en una atmósfera de 5 % de CO₂ para permitir la adsorción del virus a las células. Enseguida se retiró el inóculo, se adicionó medio MEM fresco y se dejó incubando bajo las mismas condiciones (37 °C y una atmósfera de 5 % de CO₂) durante 18 h. Las células se congelaron y descongelaron tres veces para su lisis, y se determinó el título viral en el lisado celular para luego ser almacenado a -70 °C.

Determinación del título viral

El título viral se determinó por un método de inmunoperoxidasa (Méndez *et al.*, 2002). De manera breve, se crecieron células Caco-2 o MA104 en cajas de 96 pozos hasta que se formó una monocapa confluyente (~4-5 x10⁴ células por pozo). La monocapa se lavó dos veces con MEM y se infectó como se describió para la propagación del virus, realizando diluciones del lisado colectado. Después de 18 h a 37 °C, se fijaron las células con una solución de formaldehído al 2.5 % durante 20 min a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS. Posteriormente, la membrana de las células se permeabilizó



con una solución de Tritón X-100 al 0.2 % en PBS, durante 15 min a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron las células tres veces con PBS y se añadió un anticuerpo primario producido en conejo contra el virus (α -Yuc8, diluido 1:2,000) o bien contra la espícula viral (α -spike 1, diluido 1:1,000) descritos previamente (Méndez, Salas-Ocampo and Arias, 2004) y Espinosa et al. (Espinosa *et al.*, 2018), respectivamente; después se añadió un anticuerpo secundario (anti-conejo acoplado a peroxidasa, 1:3000) para detectar al primario. El anticuerpo primario se incubó a 4 °C durante toda la noche y el secundario durante 2 h a 37 °C, ambos se lavaron tres veces con PBS. Finalmente, se adicionó el sustrato de peroxidasa (carbazol: 5 mL de buffer acetatos 0.5 N, 1.5 mL de carbazol y 10 μ L de agua oxigenada), se lavó con agua una vez que se observó coloración y se contaron las unidades formadoras de focos (uff) en un microscopio invertido (Nikon, Japón).

Rendimiento viral

Se infectaron $\sim 4\text{-}5 \times 10^4$ células Caco-2 y MA104 a multiplicidades de infección (MOI) crecientes (0.002, 0.004, 0.008, 0.016, 0.032 y 0.064 uff/célula). Después de 18 h de incubación a 37 °C, las células infectadas se lisaron congelando-descongelando 3 veces y se determinó el título viral.

Ensayo de inmunofluorescencia

Células MA104 y Caco-2 confluentes crecidas en cubreobjetos de vidrio ($\sim 1.3 \times 10^5$ células por cubreobjetos), se infectaron a diferentes MOI's (0.019, 0.039, 0.078, 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5 y 5 uff/célula). Después del proceso de infección, las células se fijaron con paraformaldehído (Sigma) al 2 % en PBS durante 20 min a temperatura ambiente y se permeabilizaron durante 15 min con 0.5 % de Tritón X-100 (Sigma) en solución de bloqueo (1 % BSA -albúmina sérica bovina-, en PBS, NH_4Cl 50 mM). Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo primario adecuado diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Las células se lavaron con PBS- NH_4Cl 50mM y se dejó durante 5 min en solución de lavado, este proceso se repitió tres veces. Enseguida, se incubaron las células con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa 488 (1:1000 en solución de bloqueo) por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente,



la monocapa se incubó con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Invitrogen, USA) 30 nM durante 30 min. Los cubreobjetos fueron montados con Citifluor AF1 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) en portaobjetos y observadas en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axioskop 2, Alemania) acoplada a una cámara digital (Photometrics Cool Snap HQ).

Concentración y purificación de partículas virales

Monocapas confluyente de células Caco-2, clona C2Bbe1, en frascos de 150 cm² se infectaron a una MOI de 3 con HstV-1 y -8 durante 18 h, como se describió previamente. Para la purificación de los virus se siguió la metodología descrita por Aguilar-Hernández (Aguilar-Hernández, López and Arias, 2018). De manera breve, se despegaron por raspado las monocapas de células infectadas, se congelaron y descongelaron tres veces para lisar. El lisado se trató con 200 µg/mL de tripsina durante 1 h a 37 °C, se clarificó el lisado por centrifugación a 2,000 xg durante 10 min y el sobrenadante obtenido se filtró en una membrana con poro de 45 µm (Corning). Una vez filtrados, los sobrenadantes se ultracentrifugaron a 50,000 xg por 16 h a 4 °C en el rotor SW55Ti (Beckman Coulter) usando tubos de propileno (Beckman Coulter) para sedimentar el virus. Las partículas sedimentadas se resuspendieron en 500 µL de buffer TNE (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 0.1 M, EDTA 10 mM) para obtener virus concentrado (empleado en los ensayos de inmunofluorescencia y curvas de crecimiento de un solo ciclo).

Si se requería obtener partículas virales purificadas, el virus se resuspendió en 4 mL de buffer TNE y se ajustó la suspensión a 0.5 % V/V con el detergente octil glucósido (stock al 5 %). Se incubó durante 30 min a 4 °C para liberar el virus asociado a membranas y se centrifugó a 200,000 xg por 2 h en el rotor SW55Ti (Beckman Coulter), a través de un colchón de sacarosa al 30 % en TNE para sedimentar el virus. El virus purificado se resuspendió en 500 µL de buffer TNE y se guardó en alícuotas a -70 °C.



Cinética de crecimiento de un solo ciclo

En una placa de 96 pozos se infectó con una MOI de 3 ufc/célula. A diferentes horas post infección (hpi) (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 24 horas) se retiró el sobrenadante y se cosecharon las células. Las células y sobrenadante se congelaron y descongelaron tres veces, el lisado total se activó con 200 µg/mL de tripsina a 37 °C durante 1 h, en un ambiente con 5 % de CO₂ y se determinó el título viral a los diferentes tiempos.

Extracción de RNA viral

Se infectó una monocapa de células Caco-2 con una MOI de 3 y a las 18 h post-infección se descartó el sobrenadante y se adicionaron 300 µL de trizol (ThermoFisher) por cada 1×10^5 - 10^7 células. Después de mezclar por pipeteo, las células se transfirieron a un tubo Eppendorf, se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se adicionaron 200 µL de cloroformo por cada 1 mL de trizol. Se incubó 2-3 min a temperatura ambiente y se centrifugó 15 min a 12,000 xg a 4 °C, para luego colectar la fase acuosa. Los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa se precipitaron con 500 µL de isopropanol por cada 1 mL de trizol añadido al inicio del protocolo de extracción; la muestra se centrifugó durante 10 min a 12,000 xg a 4 °C, se descartó el sobrenadante, y el pellet se lavó suavemente con etanol frío al 75 %. Una vez seco el pellet, se resuspendió en agua libre de RNAsas, se trató con DNAsa (ThermoFisher) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se almacenó a -70 °C.

Transcripción *in vitro* del plásmido pT7CFEG-Luc

El plásmido pT7CFEG-Luc (Figura 11) se transcribió de acuerdo con las instrucciones del fabricante empleando el kit MEGAscript® (Life technologies), para obtener el mRNA que codifica para la proteína luciferasa.

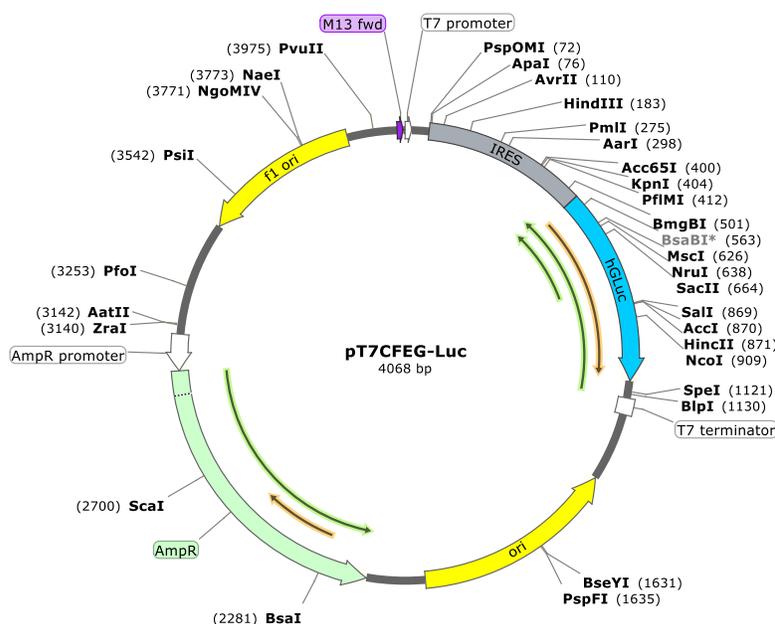


Figura 11: Mapa del plásmido pT7CFEG-Luc.

Transfección

Se realizó una mezcla de lipofectamina 2000 (ThermoFisher) en MEM (2 μ l de oligofectamina por 100 μ L de MEM) y se incubó a 37 °C durante 10 min. A la mezcla se le añadieron 800 ng de RNA_{GLuc} transcrito *in vitro* o RNA viral, y se dejó reposar 20 min a 37 °C. Se adicionaron 100 μ L de la mezcla a una monocapa con una confluencia del 60-80 % en una placa de 48 pozos ($\sim 1.3 \times 10^5$ células Caco-2, MA104, MDCKII/pozo). Luego de 6 h se cambió el medio a DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle Medium – High Glucose) suplementado con 15 % de suero fetal bovino. Las células transfectadas con RNA viral se colectaron 24 h después de la transfección junto con los sobrenadantes, para luego determinar el título viral.

Detección de luciferasa

Se colectaron los sobrenadantes que contienen la luciferasa sintetizada a partir del plásmido pT7CFEG-Luc y luego excretada al medio. Ésta se detectó de acuerdo con las instrucciones del fabricante empleando el kit BioLux® Gaussia Luciferase (New England).



Clonación de células MA104

Se empleó un método alternativo al aislamiento de clones individuales usando cilindros de clonación (Domann and Martinez, 1995). De manera breve, la monocapa celular se despegó con solución de tripsina al 0.025 %, las células despegadas se contabilizan en un equipo Countess II (LifeTechnologies) y se colocan de 15 a 20 células por pozo en una placa 6 pozos. Se incuban en las mismas condiciones que las células MA104, en medio Advanced DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-Thermo Scientific), en un ambiente con 5 % de CO₂ a 37 °C hasta observar la formación de colonias separadas. Se procede al aislamiento de las colonias despegándolas con ayuda de un papel filtro estéril de 3 mm de diámetro empapado en tripsina al 0.025 %. Cada colonia aislada se pasa a un pozo de una placa de 24 pozos y se deja crecer en las condiciones mencionadas arriba hasta llegar a confluencia. Una vez que se observa confluencia en los pozos, las células clonadas se propagan en áreas más grandes para su posterior caracterización.



Resultados

En este proyecto, se propuso identificar el(los) paso(s) del ciclo de replicación de astrovirus de humano serotipos 1 (HAstV-1) y 8 (HAstV-8) que restringe(n) su tropismo en líneas celulares establecidas. Una de estas líneas es MA104, que es parcialmente permisiva a la infección, ya que en ella se produce un título viral 3 logaritmos menor que en células Caco-2, las cuales representan el estándar de oro para la replicación de astrovirus. Existen dos posibilidades para el menor rendimiento viral observado en esta línea celular. La primera es que el 100 % de la población de células MA104 se esté infectando, pero que el rendimiento de virus por célula sea menor que en Caco-2 y la segunda es que sólo una subpoblación de células MA104 pueda ser infectada.

Las células permisivas Caco-2 producen mayor cantidad de progenie viral de HAstV-1 y HAstV-8 que las células parcialmente permisivas MA104

Para discernir entre estas dos posibilidades primero se determinó si la cantidad de partículas virales infecciosas que se produce en cada célula individual de Caco-2 es la misma que la que se obtiene en las células MA104. De ser el caso, esto sugeriría que la replicación del virus no está afectada en las células MA104 en comparación con Caco-2.

Para ello, se infectaron las líneas celulares Caco-2 y MA104 a diferentes MOIs (0.002, 0.004, 0.008, 0.016, 0.032, 0.064 uff/célula). A las 18 h post-infección las células se lisaron por congelación/descongelación y la cantidad de virus infeccioso producido se tituló con el procedimiento indicado anteriormente para células Caco-2. Para asegurar que el número de células infectadas fuese correcto, se realizó al mismo tiempo una infección a las MOIs indicadas anteriormente, a las 18 h post-infección éstas se tiñeron por el método de inmunoperoxidasa y se contó el número de células que se infectaron originalmente, esto nos permitió relacionar el número de partículas virales infecciosas producidas por cada célula infectada.



Después de realizar tres réplicas biológicas con dos réplicas técnicas cada una de ellas (Tabla 2), se encontró que en las células Caco-2 se producen 143 y 328 virus por célula infectada para los serotipos 1 y 8, respectivamente. Para las células MA104 se obtuvo un rendimiento menor, con solo 34 y 24 partículas infecciosas por célula infectada para los serotipos 1 y 8, respectivamente. Así, para HAstV-1, la progenie viral producida en Caco-2 es 4 veces mayor que en MA104, mientras que en HAstV-8 esta diferencia es de 13 veces (Figura 12).

Línea celular	Partículas infecciosas por célula infectada	
	HAstV-1	HAstV-8
Caco-2	143 ± 16	328 ± 41
MA104	34 ± 10	24 ± 3

Tabla 2: Partículas infecciosas de HAstV producidas por diferentes líneas celulares a las 18 hpi. La determinación se llevó a cabo por ensayos de inmunoperoxidasa en los que se determinó el número de células infectadas y el virus producido por estas células infectadas, para así relacionar ambos valores. Los datos son expresados como partículas infecciosas por célula infectada con el error estándar de la media.

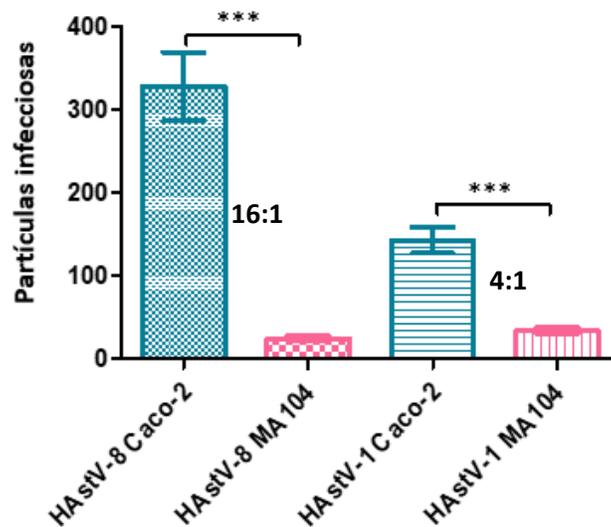


Figura 12: La producción de partículas infecciosas es menor en células MA104 a las 18 hpi. La determinación se llevó a cabo por ensayos de inmunoperoxidasa en los que se determinó el número de células infectadas así como el virus producido por éstas células infectadas, para así relacionar ambos valores. Los datos son expresados como partículas infecciosas por célula infectada, las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3). Se señala la relación de partículas infecciosas células Caco-2:células MA104. Los datos se analizaron por medio de GraphPad Prism por una prueba de Mann-Whitney; *** p < 0.0001.



Estos resultados sugieren que la permisividad de los virus en células MA104 está limitada en algún paso del ciclo de replicación posterior a la entrada, pues una vez que éste infecta a la célula su rendimiento es notablemente menor en las células MA104 comparado con las Caco-2.

A diferencia de las células Caco-2, solo una fracción de las células MA104 es permisiva a la infección.

Como un siguiente aspecto en la caracterización del tropismo celular de HAstV, se decidió determinar si el 100 % de las células Caco-2 y MA104 dentro de una población son infectables. Para lograr lo anterior, se añadieron cantidades crecientes de virus a monocapas de Caco-2 y MA104 y se determinó el porcentaje de células infectadas por el método de inmunofluorescencia. En estos ensayos (Figura 13) las células individuales se identificaron por tinción de los núcleos celulares con DAPI, y las células infectadas con un anticuerpo que reconoce a las proteínas estructurales del virus (α -spike 1 y α -spike 8). Se determinó el porcentaje de células infectadas a diferentes MOI crecientes: 0.019, 0.039, 0.078, 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5 y 5 uff/célula.

A cada multiplicidad evaluada se tomaron fotografías de 6 campos al azar, con un objetivo 20X para ambas líneas celulares. Las imágenes se procesaron en el programa ImageJ (National Institutes of Health) y a partir de estas imágenes se contaron el número de células totales (marcadas en azul) y células infectadas (marcadas en rojo), para así determinar un valor porcentual promedio de células infectadas a las diferentes MOI evaluadas.

Al infectar las células Caco-2 con HAstV-1 a MOI creciente (0.002, 0.004, 0.008, 0.016, 0.032, 0.064, 0.128, 0.256, 0.512, 1.024, 2.048, 4.096 uff/célula) se observó que a medida que se aumenta la concentración de virus, aumenta la cantidad de células infectadas (Figura 13). Al comparar los serotipos 1 y 8 se observó el mismo efecto, las células Caco-2 infectadas aumentan conforme se añade mayor cantidad de virus (Figura 14a y b) hasta tener casi un 100 % de células infectadas.

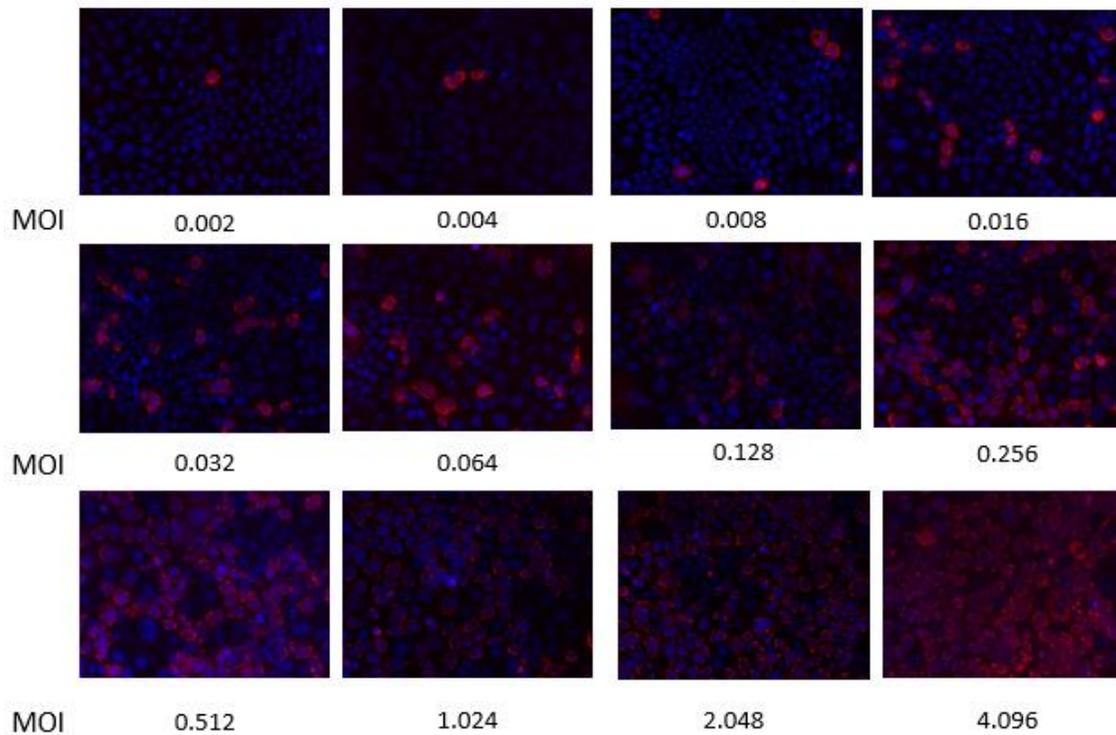


Figura 13: El porcentaje de células Caco-2 infectadas aumenta conforme aumenta la MOI de HAstV-1 a las 18 hpi. Por ensayos de inmunofluorescencia se identificó a las células por tinción de los núcleos celulares con DAPI, y a las células infectadas con un anticuerpo que reconoce a las proteínas estructurales del virus (α -HAstV-1), como se describe en la sección de materiales y métodos. Los valores de MOI están dados en uff/célula. (Ver Figura 14). Las muestras fueron visualizadas en un microscopio de epifluorescencia (ver Materiales y Métodos) con un objetivo 20X.

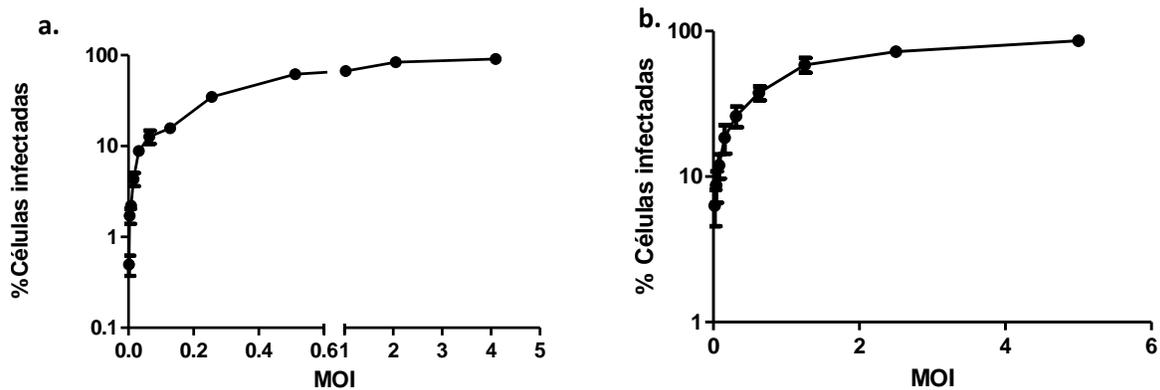


Figura 14: El porcentaje de células Caco-2 infectadas aumenta de forma proporcional a la MOI en HAstV-1 (a) y HAstV-8 (b) a las 18 hpi. Se infectaron $\sim 1.3 \times 10^5$ células en cubreobjetos de vidrio a MOI crecientes. Las células se identificaron por tinción los núcleos celulares con DAPI, y las células infectadas con un anticuerpo que reconoce a las proteínas estructurales del virus (α -HAstV-1 y α -Yuc8), como se describe en la sección de materiales y métodos. Por cada MOI se contaron 200-300 células por campo, de 6 campos tomados al azar, con un objetivo de 20X, se procesaron las imágenes en ImageJ (National Institutes of Health) y se determinó el porcentaje de células infectadas. Los datos se expresan como porcentaje de células infectadas respecto a la MOI de infección, las barras representan el error estándar de la media de dos ensayos independientes (n=2). Los datos se analizaron por medio de GraphPad Prism.

Dado que el comportamiento es similar para ambos virus se procedió a observar el comportamiento en la línea celular MA104, solo para el serotipo 8. Como se mencionó anteriormente, en la línea celular Caco-2 clona C2Bbe1, la gran mayoría de las células pueden ser infectadas por HAstV-8 y por tanto dicha línea se infecta de manera bastante homogénea. De manera contrastante, la línea celular MA104 mostró un patrón de infección bastante inusual (Figura 15), a multiplicidades de infección bajas parece aumentar de manera lineal el porcentaje de células infectadas, sin embargo, al llegar a un aproximado de 10 % de células infectadas se detiene el aumento y permanece casi constante (Figura 16 y Tabla 3).

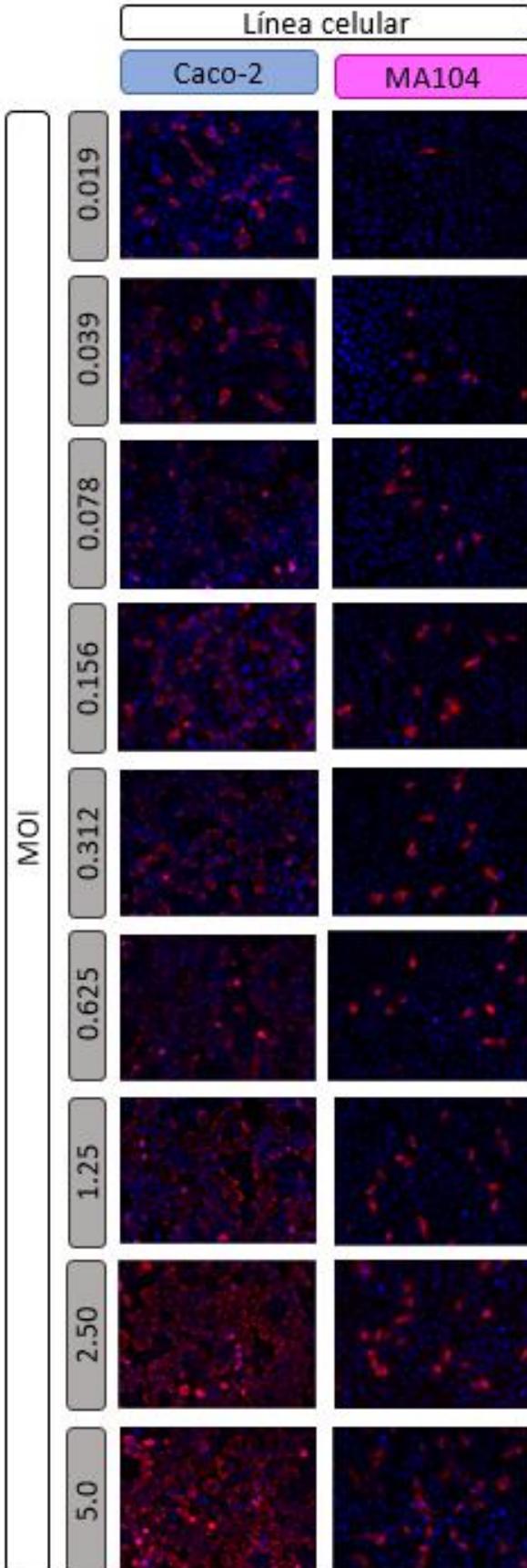


Figura 15: El patrón de células MA104 infectadas se comporta de manera distinta que el de la línea celular Caco-2 al ser infectadas a MOI creciente con HAstV-8 a las 18 hpi. Mediante ensayos por inmunofluorescencia, se identificaron células por tinción núcleos celulares con DAPI, y las células infectadas con un anticuerpo que reconoce a las proteínas estructurales del virus (α -Yuc8), como se describe en la sección de materiales y métodos. Los valores de MOI están dados en uff/célula. (ver Figura 15). Las muestras fueron visualizadas en un microscopio de epifluorescencia (ver Materiales y Métodos) con un objetivo 20X.

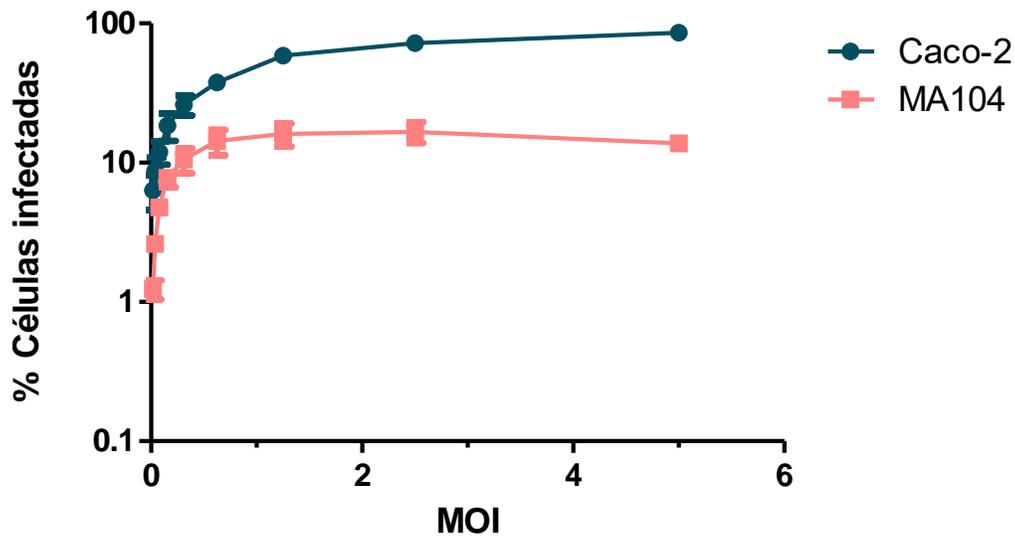


Figura 16: El porcentaje de células MA104 infectadas con HAstV-8 es menor que en células Caco-2 a 18 hpi. Se infectaron $\sim 1.3 \times 10^5$ células en cubreobjetos de vidrio a MOI crecientes (0.019, 0.039, 0.078, 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5 y 5 uff/célula). Las células se identificaron por tinción los núcleos celulares con DAPI, y las células infectadas con un anticuerpo que reconoce a las proteínas estructurales del virus (α -Yuc8), como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Por cada MOI se contaron 200-300 células por campo, de 6 campos tomados al azar, con un objetivo de 20X, se procesaron las imágenes en ImageJ (National Institutes of Health) y se determinó el porcentaje de células infectadas. Los datos se expresan como porcentaje de células infectadas respecto a la MOI de infección, las barras representan el error estándar de la media de dos ensayos independientes (n=2). Los datos se analizaron por medio de GraphPad Prism.

MOI	% Células Caco-2 Infectadas	% Células MA104 Infectadas	% Células infectadas teórico
0.019	6.33 \pm 1.77	1.23 \pm 0.19	1.88
0.039	8.73 \pm 2.11	2.61 \pm 0.17	3.82
0.078	11.94 \pm 2.24	4.77 \pm 0.45	7.50
0.156	18.49 \pm 4.14	7.78 \pm 1.11	14.44
0.312	26.04 \pm 4.24	10.53 \pm 2.14	26.80
0.625	37.59 \pm 4.21	14.30 \pm 2.97	46.47
1.25	58.65 \pm 6.81	16.05 \pm 3.00	71.35
2.5	72.37 \pm 3.99	16.68 \pm 2.84	91.79
5.0	85.98 \pm 1.91	13.76 \pm 0.79	99.33

Tabla 3: Porcentaje de células infectadas a diferentes MOIs. Determinado por ensayos de inmunofluorescencia, a las 18 hpi correspondiente a la Figura 15. Los datos son expresados como porcentaje de células infectadas con el error estándar de la media. Se señala el porcentaje de células infectadas teórico, correspondiente a la distribución de Poisson.



Los datos sugieren que la línea celular MA104 es heterogénea a la infección (a diferencia de la línea celular Caco-2), pues aun infectando a MOI de 5, en la cual esperaríamos que más del 99 % de las células estén infectadas, en promedio, solo 13 % de la población total de células puede ser infectada con HAstV-8.

Solo un porcentaje de células MA104 es permisivo a la infección por astrovirus serotipos -1 y -8

Al evaluar los resultados que determinan que la línea celular MA104 se muestra heterogénea a la infección y que solo un aproximado de 13 % de las células pueden ser infectadas, se pensó en un posible error durante la determinación del título viral en las células mencionadas, calculado en base a una sola dilución del virus. Por ello, se concentraron los virus HAstV-1 y HAstV-8 (Yuc-8) y se determinó el título viral incluyendo varias diluciones. El título se determinó por el método de inmunoperoxidasa (ver Materiales y Métodos) y se graficó la dilución del virus vs. el título viral para cada dilución (Figura 17).

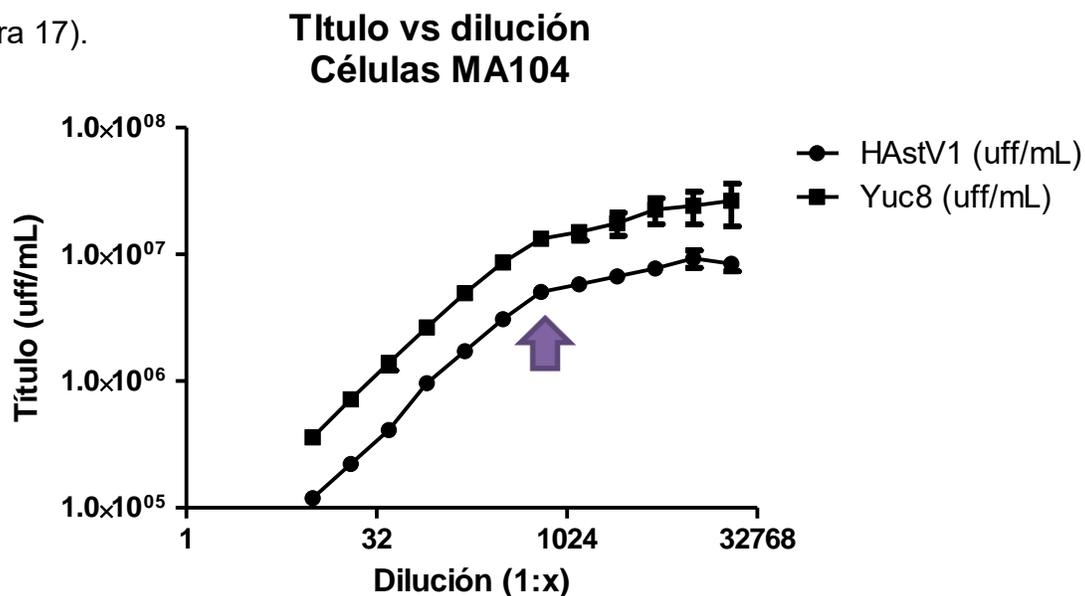


Figura 17: Solo un máximo de células MA104 pueden infectarse con HAstV-1 y -8. A partir del virus concentrado se llevaron a cabo diluciones dobles seriadas 1:x ($x=10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560, 5120, 10240$ y 20480) con las cuales se infectó una placa de 96 pozos con células MA104, para luego detectar por el método de la inmunoperoxidasa las células que se infectaron. El título viral es cambiante cuando el virus está concentrado, mientras que una vez que se ha diluido varias veces (después de la flecha, dil 1:640), el título viral permanece constante. Los datos del título se expresan como unidades formadoras de foco por mililitro (uff/mL), las barras representan el error estándar de la media de dos ensayos independientes ($n=2$). Los datos se analizaron por medio de GraphPad Prism.



El experimento mostró un patrón inesperado, pues el título viral debería mantenerse constante a lo largo del gráfico, sin embargo, como podemos observar, en concentraciones altas (menos diluido), el título viral para ambos virus aumenta (debería mantenerse constante, pues se trata de la misma muestra de virus), es de la dilución 1:640 en adelante donde el título viral se conserva a medida que el virus va siendo diluido.

Dicho de otra manera, aunque el virus esté concentrado, se observa un número máximo de células MA104 infectadas con ambos serotipos (HAstV-1 y -8), por esta razón se debe ser muy cauteloso al determinar el título viral en estas células. Posibles errores en experimentos anteriores pudieron haber ocurrido al no haber contemplado esta característica de la infección de las células MA104, ya que el título viral calculado con base en diluciones bajas, dan títulos diferentes cada una de ellas, de forma incorrecta.

Por tanto, para ambos serotipos (HAstV-1 y -8) las células MA104 se muestran heterogéneas a la infección, pues solo un porcentaje bajo de éstas puede ser infectado.

El cultivo de células MA104 está conformado de distintas subpoblaciones en función de su permisividad hacia los astrovirus

En este trabajo se decidió evaluar la posibilidad de obtener poblaciones clonadas de células MA104 que tuvieran diferente susceptibilidad para ser infectadas por HAstV. Se clonaron células con el método descrito anteriormente, para luego analizar si las diferentes células clonadas presentan un patrón de susceptibilidad distinto a la infección por astrovirus.

Las células clonadas se infectaron a MOI de 2.5, multiplicidad que nos permite ver el porcentaje “máximo” de células infectadas sin usar gran cantidad de virus (ver Figura 15) y se determinó nuevamente por el método de inmunofluorescencia (Figura 19) el porcentaje de células infectadas (Figura 18):

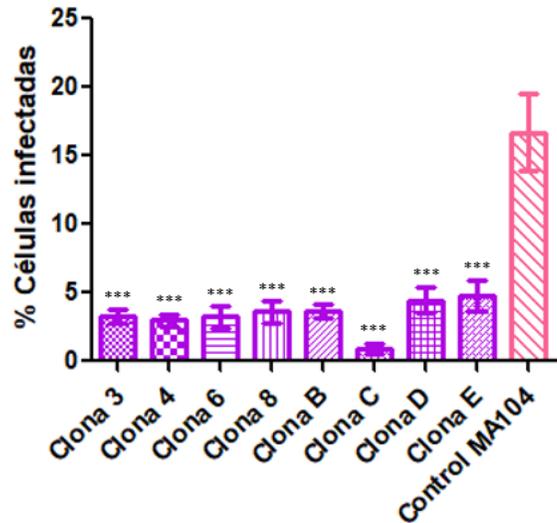


Figura 18: El porcentaje de infección de las clonas MA104 es hasta 10 veces menor que la línea celular parental. Se infectaron $\sim 1.3 \times 10^5$ células en cubreobjetos de vidrio a MOI de 2.5 ufc/célula de HAstV-8, hasta las 18 hpi. Las células se identificaron por tinción de los núcleos celulares con DAPI, y las células infectadas, con un anticuerpo que reconoce a las proteínas estructurales del virus (α -Yuc8), como se describe en la sección de materiales y métodos. Se tomaron 6 campos al azar, con un objetivo de 20X, se procesaron las imágenes en ImageJ (National Institutes of Health) y se determinó el porcentaje de células infectadas. Los datos son expresados como porcentaje de células infectadas, las barras representan el error estándar de la media de dos ensayos independientes ($n=2$). Se analizaron por medio de GraphPad Prism por una prueba de ANOVA (análisis de varianza); *** $p < 0.0001$.

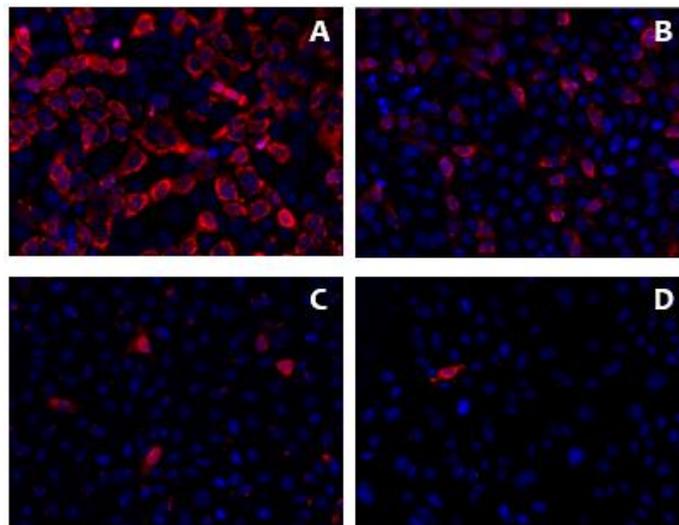


Figura 19: Las clonas obtenidas de MA104 infectadas con HAstV-8 se infectan menos que las células Caco-2 y la línea celular MA104 parental, 18 hpi. Se infectó a MOI 2.5 ufc/célula las distintas líneas celulares y se detectó mediante ensayos de inmunofluorescencia el porcentaje de células infectadas. Se muestran en azul los núcleos celulares y en rojo las células infectadas (marcadas por las proteínas de la cápside viral α -Yuc8). A) Línea celular Caco-2. B) Línea celular MA104. C) Clona 4. D) Clona C. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio de epifluorescencia (ver Materiales y Métodos) con un objetivo 20X.



Los resultados sugieren que la línea celular MA104 está conformada por al menos dos subpoblaciones con diferente susceptibilidad a la infección por HAstV. En este trabajo se pudieron aislar diversas clonas con baja permisividad, sin embargo, no se pudo aislar alguna clona con alta permisividad. Los resultados más interesantes se observan en la clona C, en donde la diferencia en porcentaje de células infectadas es de 10 veces aproximadamente; sería interesante aislar nuevas clonas a partir de la clona C y analizar si puede obtenerse una clona de células MA104 que sea totalmente refractaria a la infección por astrovirus.

La curva de crecimiento de un solo ciclo de HAstV-8 está retrasada en etapas tempranas de la infección en la línea celular MA104

Con el propósito de identificar si alguna etapa durante el ciclo de replicación de astrovirus serotipo 8 está retardada en la línea celular parcialmente permisiva, se llevó a cabo una curva de crecimiento de un solo ciclo en las líneas celulares Caco-2 y MA104, en la que se infectaron $\sim 5 \times 10^4$ células con una MOI de 3. Se colectaron células y sobrenadante a distintas horas post-infección (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 24 hpi), se congeló y descongeló tres veces para lisar las células y se determinó el título viral a los diferentes tiempos.

En la línea celular Caco-2, el gráfico muestra las etapas que se establecen normalmente en una curva de crecimiento (Figura 20). Una fase de eclipse de ~ 7 h de duración, etapa en que no se recupera virus infeccioso pues las partículas virales han liberado su material genético para comenzar su replicación y traducción; la pequeña cantidad de virus infeccioso detectado probablemente es virus adsorbido a la superficie celular, cuyo material genético no se ha desnudado (desencapsidado). Posteriormente sigue la fase de explosión (“burst”), de las 7 a las 15 hpi, donde el virus intracelular comienza a incrementar, se producen y se liberan grandes cantidades de partículas virales. Finalmente, la fase estacionaria, durante esta etapa la producción de virus se detiene, en este caso de las 15 a las 24 h (se muestra con forma de meseta en el gráfico); durante este periodo las células se vuelven metabólicamente y estructuralmente incapaces de soportar la replicación (Flint *et al.*, 2015).



	CACO-2	MA104
HPI	uff/mL	uff/mL
0	4.55×10^5	2.91×10^6
3	2.50×10^5	3.23×10^6
6	2.06×10^5	1.38×10^6
9	1.00×10^6	1.14×10^6
12	1.90×10^7	2.65×10^6
15	5.95×10^7	5.52×10^6
18	7.51×10^7	7.26×10^6
24	1.06×10^8	6.20×10^6

Tabla 4: Curva de crecimiento de un solo ciclo de HAstV-8. Valores promedio de los títulos virales a las distintas horas post-infección (hpi) de dos ensayos independientes (n=2).

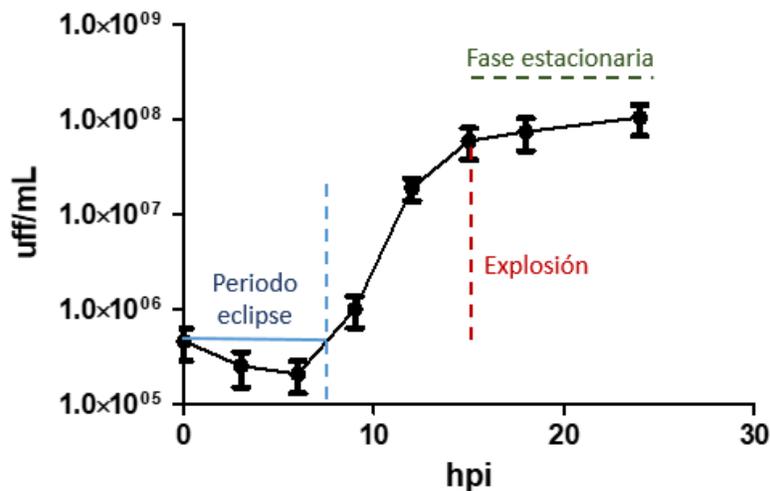


Figura 20: Curva de crecimiento de HAstV-8 en células Caco-2. Se llevó a cabo una infección a MOI de tres, dicha infección se llevó a cabo a distintos tiempos, para retirar células y sobrenadante a las 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 24 horas post infección (hpi). Una vez retirado, células y sobrenadante se lisaron y titularon. El gráfico muestra las etapas características de una curva de crecimiento de un solo ciclo: periodo eclipse, explosión y una fase estacionaria. Los datos son expresados como unidades formadoras de focos por mililitro (uff/mL). Las barras representan el error estándar de la media de dos ensayos independientes (n=2) y se analizaron por medio de GraphPad Prism.

Para la línea celular MA104, dichas fases se pudieron observar con más dificultad (Figura 21). En esta gráfica se notó una fase de explosión limitada, muy probablemente debido a que del total de la población de células MA104 se infectan solamente el 13 %, además de que el rendimiento de partículas infecciosas por célula infectada es menor, por lo que, como se esperaba, fue de menor proporción comparado con el de las células Caco-2.

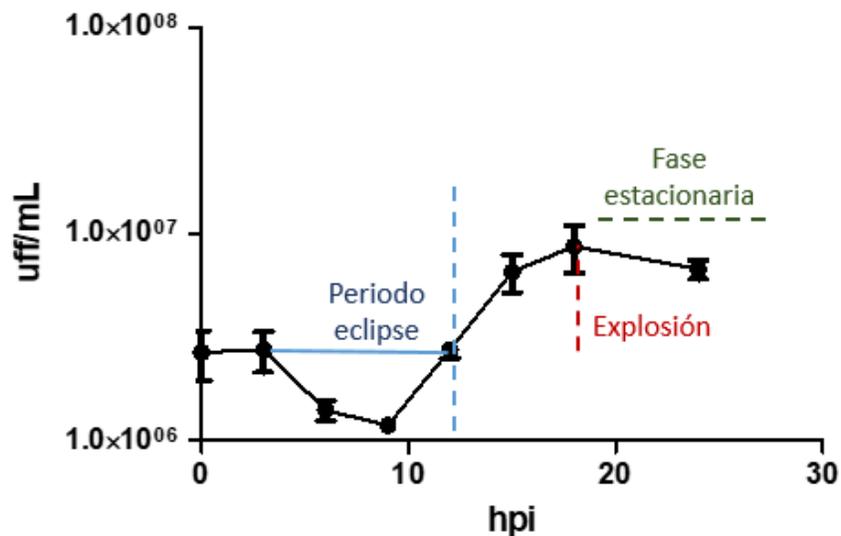


Figura 21: Curva de crecimiento de HAstV-8 en células MA104. Se llevó a cabo una infección a MOI de tres, dicha infección se llevó a cabo a distintos tiempos, para retirar células y sobrenadante a las 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 24 horas post infección (hpi). Una vez retirados, células y sobrenadante se lisaron y titularon. El gráfico muestra las etapas características de una curva de crecimiento de un solo ciclo: periodo eclipse, de explosión y una fase estacionaria. Los datos son expresados como unidades formadoras de focos por mililitro (uff/mL). Las barras representan el error estándar de la media de dos ensayos independientes (n=2) y se analizaron por medio de GraphPad Prism.

Al comparar ambos gráficos (Figura 22) se pudo observar que para la línea celular MA104 existe un retardamiento en la etapa inicial del ciclo de infección de ~3 h, probablemente durante la internalización del virus y/o durante la liberación del RNA. Después de este tiempo la tendencia de la gráfica es la misma para ambas líneas celulares (fase eclipse, explosión y estacionaria), aunque el inicio de la fase de explosión en las células MA104 está también retrasada 3 h con respecto a Caco-2 (12 h en MA104 vs 9 h en Caco-2). Esto era de esperarse con base al retardamiento a la internalización/desnudamiento del virus en MA104.

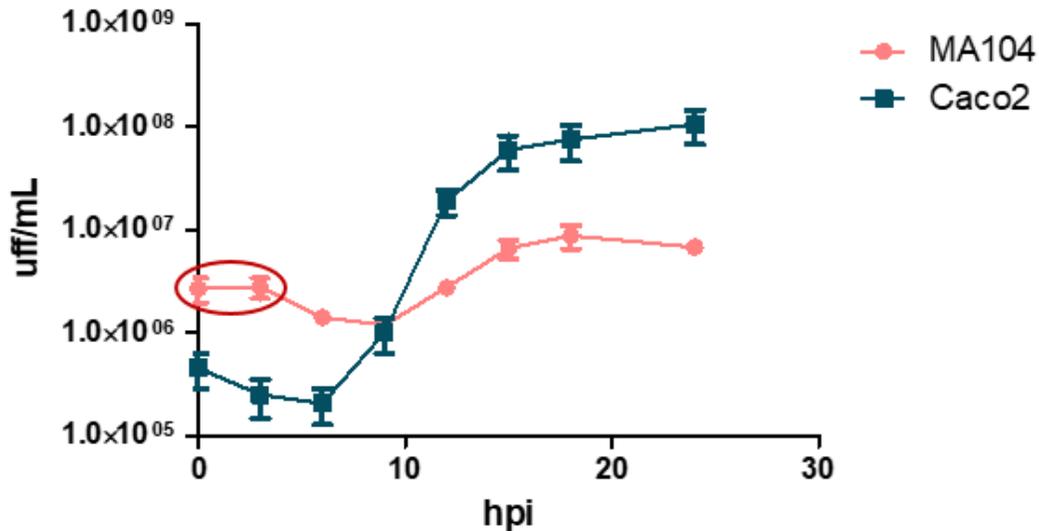


Figura 22: La curva de crecimiento de un solo ciclo de HAsV-8 está retrasada en células MA104. Se llevó a cabo una infección a MOI de tres, dicha infección se llevó a cabo a distintos tiempos, para retirar células y sobrenadante a las 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 24 horas post infección (hpi). Una vez retirados, células y sobrenadante se lisaron y titularon. Los gráficos muestran una tendencia similar luego de eliminar las tres horas de retraso inicial del ciclo de infección en las células MA104 (señaladas en un ovalo rojo). Los datos son expresados como unidades formadoras de focos por mililitro (uff/mL), las barras representan el error estándar de la media de dos ensayos independientes (n=2). Se analizaron por medio de GraphPad Prism.

Finalmente, se apreció que a pesar de infectar a la misma multiplicidad de infección (MOI=3), el tiempo cero en la línea celular MA104 mostró más cantidad de virus que el de las células Caco-2, esto debido a que para conseguir esta multiplicidad en las células MA104 se requiere mayor cantidad de virus pues son menos permisivas que la línea celular Caco-2, en la cual se titulan todos los lisados obtenidos; ahora sabemos que sólo un aproximado de 13 % de las células pueden ser infectadas y bastaría con infectar con una MOI de 0.14 para infectar a todas las células permisivas. Esto es, infectar a una MOI de 3 es un “desperdicio” de virus, ya que con esta MOI debieran infectarse más del 95 % de las células, de acuerdo a la “distribución de Poisson” (ver Tabla 3), y sólo se infecta aproximadamente un 13 %.



En las células MDCKII y MA104 la infección por astrovirus está limitada tanto durante la entrada como en una etapa posterior a la liberación del RNA

En el laboratorio, Aguilar-Hernández observó que las células MDCKII (células epiteliales de riñón de perro) son refractarias a la infección, es decir, éstas no se infectan. Además, se sabe que el genoma de astrovirus es una cadena simple de RNA de polaridad positiva, por lo que puede iniciar el ciclo de replicación del virus si se introduce al citosol celular por transfección. De esta manera, para evaluar si los factores que determinan el tropismo en las células MDCKII y MA104 se encuentran en la adhesión, entrada y/o desnudamiento del virus y no en un paso posterior durante la replicación, se transfectaron 200 ng de RNA viral obtenido de células infectadas con HAstV-8. A las 48 h post-transfección las células se lisaron por congelación descongelación y la cantidad de virus infeccioso producido se tituló con el procedimiento indicado anteriormente para células Caco-2. Al mismo tiempo se llevó a cabo una transfección idéntica, pero a las 48 h post-transfección las células se tiñeron por el método de inmunoperoxidasa y se contó el número de células positivas para antígeno viral.

Para normalizar la eficiencia de transfección en las diferentes líneas celulares se transfectó RNA transcrito *in-vitro* que codifica para una luciferasa que se secreta y puede ser detectada en el sobrenadante. Para reportar este valor, las unidades relativas de luz (URL) detectadas en células sin transfectar se le restaron a las URL medidas luego de 48 h de haber sido transfectadas con el RNA transcrito *in-vitro* que codifica para luciferasa.

Se detectó una mayor cantidad de URL en las células Caco-2, seguidas de las células MDCKII y finalmente las células MA104 (Tabla 5 y Figura 23). Al titular la progenie viral producida en las tres líneas celulares después de la transfección del RNA viral, se observó una diferencia de un logaritmo entre la línea celular Caco-2 y MA104, ésta última con el menor rendimiento; para la línea celular MDCKII, apenas se pudieron contar uno o dos focos infecciosos durante la titulación del virus y se obtuvo un rendimiento de apenas 7 uff totales (Tabla 5 y Figura 24).



Considerando el valor de la actividad de luciferasa como eficiencia de la transfección, se observan dos cosas; primero, que las células Caco-2 se transfectan mejor que las otras dos y producen mayor cantidad de progenie viral, y segundo, que a pesar de que las células MA104 se transfectan de manera similar a las MDCKII, en las células MA104 se pudo recuperar mayor cantidad de virus (Figura 23).

	Detección Luc (URL)	Progenie Viral (uff total)	Células transfectadas positivas a antígeno viral (total)	Partículas infecciosas por célula transfectada
Caco-2	9.81E+04	2.51E+03	9.56E+02	3
MA104	2.63E+04	4.27E+02	4.60E+02	1
MDCKII	3.40E+04	7.33E+00	2.33E+01	0

Tabla 5: Cantidad de partículas infecciosas al transfectar RNA viral en diferentes líneas celulares. Valores promedio de las unidades relativas de luz (URL) detectada a las 48 h post transfección, para normalizar la eficiencia de transfección; títulos virales promedio de la progenie colectada a las 48 h post transfección; el título viral total de las células transfectadas. La determinación de las partículas infecciosas por célula transfectada se llevó a cabo relacionando la progenie viral producida y el número de células transfectadas con el RNA viral de HAstV-8, detectadas con el ensayo de inmunoperoxidasa.

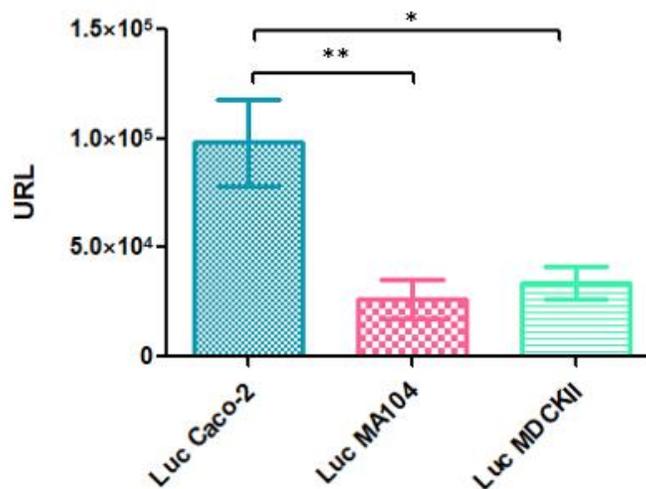


Figura 23: Las células Caco-2 muestran mejor eficiencia de transfección que las células MA104 y MDCKII. Se llevó a cabo una transfección de RNA transcrito in vitro que codifica para luciferasa y se midió la actividad de luciferasas a las 48 post-transfección (ver metodología). Los datos se expresan como unidades relativas de luz (URL). Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3). Los datos se analizaron por una prueba de ANOVA por medio de GraphPad Prism; ** p < 0.0068.

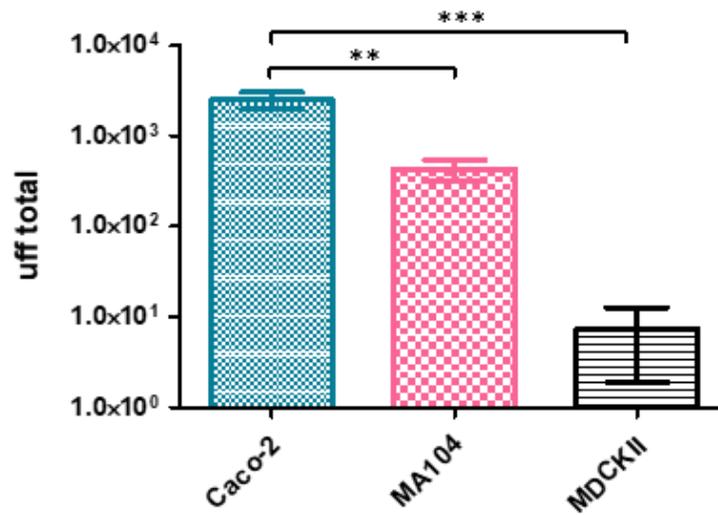


Figura 24: La progenie viral infecciosa producida por la transfección de RNA viral es mayor en las células Caco-2. Se transfectó a las líneas celulares Caco-2, MA104 y MDCKII con RNA extraído de un lisado viral (ver Materiales y Métodos) y se determinó la progenie viral a las 48 h post-transfección en células Caco-2. Los datos son expresados como unidades formadoras de focos totales (uff total), las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3) y se analizaron por medio de GraphPad Prism por una prueba de ANOVA; * p < 0.0004.

Como se mencionó anteriormente, de manera paralela al ensayo de transfección y detección de las URL producidas por la luciferasa, se realizó una transfección en la que después de 48 h post-transfección se determinó el número de células transfectadas detectando la síntesis de antígeno viral con el ensayo de inmunoperoxidasa. Se observaron 2 veces más células positivas para antígeno viral en la línea celular Caco-2 que en la línea celular MA104 (956 y 460 uff totales respectivamente); para la línea celular MDCKII, sorprendentemente se observaron células positivas para antígeno viral de HAstV-8 (Figura 25), aunque solo se obtuvieron 23 uff totales (ver abajo).



Figura 25: Detección de la proteína viral de la cápside en células MDCKII. Se muestran tres células MDCKII en las que se detectó antígeno virales luego de ser transfectadas con 200 ng de RNA viral de HAstV-8 a las 48 h post-transfección. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio de campo claro con un objetivo 20X.

El número de células transfectadas se relacionó con la progenie viral para obtener el número de partículas infecciosas por célula transfectada (Tabla 5 y Figura 26). La máxima cantidad de partículas infecciosas por célula transfectada fue tres para la línea celular Caco-2, una para la línea celular MA104 y cero para la línea celular MDCKII.

Con los resultados de la línea celular MA104, se corroboran los datos obtenidos previamente en el experimento de partículas infecciosas por célula infectada (Tabla 2), sugiriendo fuertemente que además de la entrada (como se observó en las curvas de crecimiento), la permisividad de los astrovirus en células MA104 está limitada en algún paso del ciclo de replicación posterior a ésta ya que, además de tener un rendimiento menor luego de infectar las células, hay también un rendimiento menor comparado con las células Caco-2 al transfectar RNA viral y evadir etapas tempranas de la infección.

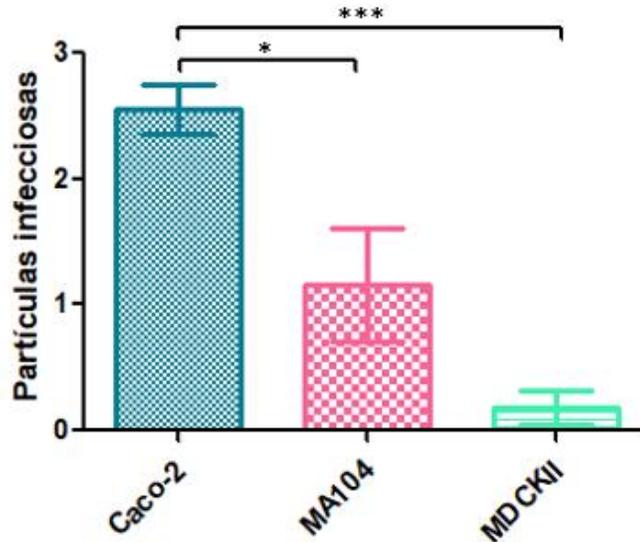


Figura 26: El número de partículas infecciosas por célula transfectada es mayor en las células Caco-2. Se transfectó a las líneas celulares Caco-2, MA104 y MDCKII con RNA extraído de un lisado viral (ver Materiales y Métodos) y se determinó el número de partículas infecciosas por célula transfectada; este valor se determinó relacionando la progenie viral total con las células que mostraron antígeno viral luego de haber sido transfectadas con 200 ng del RNA viral de HAstV-8. Los datos son expresados como partículas infecciosas por célula transfectada, las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3) y se analizaron por medio de GraphPad Prism por una prueba de ANOVA; * $p < 0.0012$.

Como se había mencionado, las células MDCKII no son permisivas a la infección por astrovirus, pero al transfectarlas con RNA viral (y evadir así la entrada) se pudieron observar unas pocas células transfectadas en las que se detectaron proteínas estructurales con el anticuerpo primario α -Yuc8 (Figura 19). Eso implica que las células MDCKII pueden llevar a cabo la replicación del virus si el ciclo se inicia con la introducción del genoma viral al citosol, aunque la replicación del RNA viral ocurre de manera sumamente ineficiente (en progenie sólo se detectaron 7 uff), lo que sugeriría que, además de existir una limitación durante la entrada del virus, al igual que para la línea celular MA104, en la línea celular MDCKII el tropismo de astrovirus está limitado en algún paso de la replicación posterior a la entrada.



En las tres líneas celulares se observó que la producción de partículas virales infecciosas por célula transfectada es muy baja comparada con el rendimiento que se obtuvo al infectar las mismas células (Tabla 2, Figura 12); Berreau y col. concluyen que al transfectar RNA mediante liposomas la proporción tan grande de moléculas de RNA “no usadas” puede volverse tóxica para las células o bien desencadenar una respuesta que puede cambiar el metabolismo (Barreau *et al.*, 2006). En nuestro caso se transfectó RNA aislado de células infectadas, es decir, el RNA transfectado contenía material genético viral así como celular y esto pudo haber afectado la producción de partículas infecciosas por las razones mencionadas.

Otra posible explicación para la reducción de partículas infecciosas por célula transfectada, es que el RNA al ser introducido a la célula a través de una vía diferente a la que regularmente usa durante un proceso de infección, no permita la replicación eficiente y se produzcan pocas partículas infecciosas. Por otro lado, se ha reportado que aproximadamente un 17 % del RNA total (viral + celular) obtenido de células infectadas es subgenómico (Guix *et al.*, 2005), porción que podría dar lugar a una cantidad detectable de proteínas estructurales, sin que necesariamente se esté replicando el genoma viral. De este modo se podría estar sobreestimando la cantidad de células que efectivamente estén replicando virus y por ello, el rendimiento viral por célula transfectada resulte muy bajo.



Discusión

Se conoce como tropismo a la predisposición de un virus para invadir y replicarse en un tipo particular de células; uno de los determinantes del tropismo son los receptores, sin embargo, la producción del receptor en un tipo de célula no asegura que la reproducción del virus pueda ocurrir. Por su parte, el rango de hospederos de un virus, se define como la habilidad de infectar un animal particular o cultivo celular (Flint *et al.*, 2015).

In vivo, los astrovirus tienen un amplio rango de hospederos, la lista de especies susceptibles a la infección de astrovirus se ha ido expandiendo hasta 80 especies, incluyendo animales domésticos, salvajes, aves y mamíferos (Mendenhall, Smith and Vijaykrishna, 2015), son un grupo con una alta variabilidad genética y cada vez hay más reportes con evidencia de eventos de recombinación; éstas características los hacen candidatos de eventos de cruce de especie hospedera y como consecuencia la adaptación del virus a nuevos hospederos (De Benedictis *et al.*, 2011; Wohlgemuth, Honce and Schultz-Cherry, 2019). Estos eventos de cruce de especie, son una posible explicación de la aparición del HAstV-MLB (Melbourne), que es más parecido a los astrovirus de rata que a los de humano (Chu *et al.*, 2010; Vu *et al.*, 2016), y los HAstV-VA (Virginia), relacionados cercanamente con astrovirus de ovino y visón (S. Finkbeiner *et al.*, 2009; S. R. Finkbeiner *et al.*, 2009; Vu *et al.*, 2017). En humanos, los astrovirus MLB y VA1, se han encontrado en heces de individuos con diarrea, además, se han asociado como causantes de infecciones en el sistema nervioso central (SNC) en individuos inmunocomprometidos, lo cual sugiere que los HAstV, podrían pasar del tracto gastrointestinal a otros tejidos y órganos (Walter *et al.*, 2001; Quan *et al.*, 2010; Vu *et al.*, 2017).

Por otra parte, la capacidad de los HAstVs para infectar diferentes líneas celulares es distinta para cada serotipo, pero en general células derivadas de humanos y simios (Caco-2, T84, HT-29, MA104) muestran una propagación exitosa y las diferentes a primates no son capaces de sustentar la infección (Brinker, Blacklow and Herrmann, 2000).



El objetivo general de éste trabajo consistió en caracterizar los pasos del ciclo de replicación de astrovirus humano serotipo 1 y 8 (HAstV-1 y HAstV-8) que determinan su tropismo en líneas celulares de diferente origen.

Las líneas celulares con las que se trabajó fueron: Caco-2, proveniente de un carcinoma de colón humano, se empleó la clona C2Bbe1, clona derivada de las células Caco-2 seleccionada en base a su homogeneidad morfológica apical, el cuál es comparable con la del colon humano. Pueden formar una monocapa polarizada con un borde apical de cepillo (Bb “brush border”), crecen despacio y son más estables a largo plazo que otras células Caco-2 (Masuda, Kajikawa and Igimi, 2010); MA104, células derivadas del epitelio de riñón de mono verde, altamente susceptibles a rotavirus de Simio SA11 y en las que Aguilar-Hernández, 2018, en su tesis de maestría encontró que se infectan 1000 veces menos que las células Caco-2; y MDCKII, aisladas de la línea celular parental MDCK (NBL-2), proveniente de riñón de perro, presenta bajos valores TER y contienen Claudina-2 (a diferencia de las MDCKI que presentan altos valores TER y no presentan la unión estrecha Claudina-2) (Dukes, Whitley and Chalmers, 2011), Aguilar-Hernández, 2018, menciona que no son capaces de establecer una infección (Aguilar-Hernández, 2018).

La línea celular Caco-2 es proveniente de intestino humano (el tipo celular blanco en ambiente natural), por lo que representa el estándar de oro para la replicación de los HAstVs; no resulta extraño que en esta línea celular los HAstVs se repliquen de forma más eficiente, y produzcan una mayor cantidad de partículas infecciosas por célula infectada que las otras dos líneas celulares. Las células MA104, producen 4 y 13 veces menos progenie viral para los serotipos -1 y -8, respectivamente, que las células Caco-2. Esto indica que algún paso después de la entrada está limitando el tropismo en células MA104. Este tipo de publicaciones sobre las diferentes eficiencias de replicación de un virus en diferentes líneas celulares son comunes, se ha reportado para virus tales como: dengue (Diamond *et al.*, 2000), rotavirus (Bass *et al.*, 1992; Londrigan *et al.*, 2000), influenza (Matrosovich *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009), hepatitis C (Sainz *et al.*, 2012; Coto-Llerena *et al.*, 2017) y Zika (Hou *et al.*, 2017). Con esta clase de estudios, se han logrado identificar factores del hospedero que están presentes (o ausentes) y que bloquean la



producción de partículas virales, en Zika se ha marcado como el inicio para dilucidar porque solo la cepa asiática y no la africana causa microencefalía y además se han determinado agentes antivirales blanco durante la entrada del virus.

Se ha reportado que la replicación de HAstV-1 es sensible a interferón, por lo que es posible que factores asociados con la respuesta inmune innata interfieran con la infectividad de astrovirus en las diferentes líneas celulares (Guix *et al.*, 2015; Marvin *et al.*, 2016).

Esta diferencia también puede deberse a alguna característica del ciclo celular, se ha observado que diferentes virus interactúan con componentes del ciclo celular para subvertir el funcionamiento celular e incrementar la eficiencia de replicación. La mayoría de los estudios se han llevado a cabo con virus de DNA y retrovirus, pues su ciclo de replicación se lleva a cabo en núcleo (Emmett *et al.*, 2004; Flint *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha demostrado que en virus de RNA también puede ser importante el ciclo celular; tal es el caso de coxsackie virus, Feuer y col., 2002, han demostrado que células con el ciclo celular en G1 o G1/S producen mayores niveles de partículas infecciosas y poliproteínas virales comparado con las células en la fase G0, o células bloqueadas en la fase G2/M (Feuer *et al.*, 2002).

Por ensayos de inmunofluorescencia se determinó el porcentaje de células Caco-2 y MA104 que pueden ser infectadas. En virus como dengue, células del mismo linaje, por ejemplo epiteliales, pueden infectarse en mayor o menor cantidad a una misma MOI (Diamond *et al.*, 2000). Para astrovirus, se observó que en una monocapa de células Caco-2 infectadas a MOI 5 con HAstV-8, un máximo de 92 % de las células pueden ser infectadas, mientras que para la línea celular MA104, en promedio se infecta un aproximado de 13 % de las células. Esto quiere decir que la línea celular MA104 se muestra heterogénea a la infección, pues solo un porcentaje bajo de éstas puede ser infectado. La posible heterogeneidad dentro de una población de células que hace que sólo una subpoblación de ellas pueda ser infectada, puede deberse a diversas razones:



Primero, puede ser debido a variaciones de las características intrínsecas de la población que compone la línea celular. Por ejemplo, se han llevado a cabo estudios donde células como Caco-2 y MDCKII, que muestran variabilidad estructural y funcional, exhiben subpoblaciones con diferentes grados de permeabilidad, transporte y propiedades metabólicas dependiendo de características como la densidad de siembra, número de pase, confluencia y condiciones de cultivo (Walter and Kissel, 1995; Volpe, 2008); algunas de estas diferencias en la población de células podría afectar su susceptibilidad para ser infectadas productivamente.

Otra posible explicación es que algún factor importante para la replicación del virus no se exprese de igual manera en todas las células. Por ejemplo, la infección por el virus del dengue se ve afectada por la expresión restringida de un receptor lectina tipo C presente en la superficie celular (Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-integrin DC-SIGN), el cual se demostró es un factor crítico para la patogénesis de dengue en etapas tempranas de la infección; las moléculas de DC-SIGN permiten una eficiente endocitosis y por tanto la replicación eficiente del virus (Lozach et al., 2005).

Por otro lado, un estudio realizado con virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) mostró que las células MA104 son heterogéneas con respecto a la permisividad del virus mediante la clonación de subpoblaciones de células MA104; en este estudio, Kim H.S. y col. obtuvieron dos clones con alta y baja permisividad (MARC-145 y L-1 respectivamente). Al comparar el rendimiento viral en las tres poblaciones observaron un aumento de 5 log en la infectividad viral de la clona MARC-145 y una disminución de 1 log de la clona L-1 con respecto a la línea celular parental MA104 (Kim et al., 1993).

Se decidió evaluar si para el caso de astrovirus, podrían obtenerse clones con un mayor y menor grado de permisividad como en el caso de PRRS, puesto que se trata de la misma línea celular MA104 y el virus es también de RNA de polaridad positiva. Se obtuvieron 10 clones, todas se infectaron en menor grado que la línea celular parental,



por lo que sería necesario seguir aislando clonas y encontrar alguna en la que el porcentaje de infección sea mayor que la línea celular parental, para así determinar que la heterogeneidad a la infección por astrovirus se debe a la presencia de clonas que son permisivas o no permisivas.

Para evaluar si alguna etapa durante el ciclo de replicación de astrovirus serotipo 8 está retardada en la línea celular MA104, se llevó a cabo una curva de crecimiento de un solo ciclo y se comparó con la misma curva pero en células Caco-2. Se observa un retardamiento en la etapa inicial de la infección de aproximadamente 3 h, este fenómeno en donde el virus no entra inmediatamente en fase de eclipse se observó en rotavirus (Bass *et al.*, 1992) luego de infectar dos líneas celulares parcialmente permisivas (células L y HEp2) y se puede explicar de dos formas, i) el virus internalizado no puede escapar de las vesículas endocíticas, o ii) la liberación del genoma es ineficiente. Por tanto, en la línea celular MA104 existe un factor limitante durante alguna etapa temprana de la infección, una de estas limitantes puede ser durante la unión del virus a la célula, Aguilar-Hernández, 2018, en su tesis de maestría mostró que HAstV-8 se une 5 veces menos en células MA104 que en células Caco-2 (Aguilar-Hernández, 2018).

Además, se observa que la fase de explosión es limitada en comparación con la misma fase en las células Caco-2, esto puede deberse a que solo una subpoblación de células MA104 se infecta y aunado a que la producción de partículas infecciosas por célula infectada es muy bajo en esta línea celular, se puede establecer una afectación en algún paso del ciclo de replicación posterior a la entrada; este fenómeno se ha observado en virus como dengue (Diamond *et al.*, 2000), hepatitis C (Sainz *et al.*, 2012; Ding, Von Schaewen and Ploss, 2014; Coto-Llerena *et al.*, 2017) y Coxsackievirus B3 (Kramer *et al.*, 1997).

Mediante la transfección de RNA viral, para evadir la entrada, sorpresivamente, se encontró que HAstV-8 puede replicarse y producir progenie viral infecciosa, aunque de manera sumamente ineficiente comparado con las otras dos líneas celulares, esto sugiere, que además de la limitación durante la entrada, existe otra limitante en una etapa posterior. En el caso de PRRS y norovirus, luego de transfectar RNA viral en células no permisivas y recuperar partículas infecciosas, se llevaron a cabo ensayos de unión en



los que observaron que el virus no se podía unir (o se unía muy poco), lo que les permitió concluir que el tropismo estaba determinado a nivel de receptor o factores de membrana (Kreutz, 1998; Guix *et al.*, 2007). Para las células MDCKII se sabe que astrovirus es capaz de unirse de manera similar que a las células MA104, es decir, 5 veces menos que la unión del virus a las células Caco-2 (Aguilar-Hernández, 2018). En conjunto, esto indica que la línea celular expresa las moléculas necesarias para el reconocimiento viral en su superficie y presenta los requerimientos intracelulares necesarios para llevar a cabo la infección, pero es posible que factores que limitan su infección estén presentes, o bien, no exprese o alguno o varios factores necesarios para que los HAstVs lleven a cabo su ciclo replicativo de forma eficiente.

Entonces, en las líneas celulares MA104 y MDCKII el tropismo está limitado en etapas tempranas de la infección y en etapas posteriores a ésta. Ejemplo de este comportamiento es el virus hepatitis C en el que se ha observado diferencia en la permisividad hacia distintas líneas de hepatoma y se ha demostrado que es parcialmente definido a nivel de entrada viral por la expresión de receptores en su superficie, deficiencias en entrada tardía y también es definido en etapas posteriores a la entrada debido a la falta de proteínas necesarias para la eficiente producción de proteínas virales que reducen la encapsidación del virus y su egreso de la célula (Sainz *et al.*, 2012; Ding, Von Schaewen and Ploss, 2014; Coto-Llerena *et al.*, 2017).



Conclusiones

Los astrovirus que infectan a humanos, muestran diferencias en su capacidad para infectar distintas líneas celulares en cultivo y su tropismo puede estar limitado en uno o varios pasos de su ciclo de replicación.

Se encontró que 91 % en una monocapa de células Caco-2 pueden ser infectadas, a diferencia de las células MA104 en la que sólo 13 % pueden infectarse con HAstV-8 (Tabla 3). Dicha limitación en la infección de las células MA104 se conserva para la infección de HAstV-1 (Figura 17) y puede explicarse por la presencia de una población heterogénea con al menos dos subpoblaciones de diferente permisividad, presentes en la línea celular parental. La clonación de subpoblaciones permitió identificar clonas que presentaron una disminución del porcentaje de células infectadas de hasta 1 log menos respecto a la línea celular parental MA104, aunque es posible que aislando un número mayor de clonas se puedan obtener células más permisivas que la línea parental.

Además de la notable heterogeneidad de la población de células MA104 en términos de susceptibilidad a ser infectadas por astrovirus, la comparación de curvas de crecimiento de un solo ciclo de HAstV-8 en células Caco-2 y MA104 revela un retardamiento de 3 h en la etapa inicial de la infección de las células MA104 (Figura 22), lo que establece una probable limitación durante su interacción con el receptor, unión, internalización del virus y/o durante la liberación del genoma viral. Aunado a esto, se pudo notar una afectación en algún paso del ciclo de replicación posterior a la entrada ya que: i) una vez que el virus infecta células MA104 se obtiene un rendimiento 4 y 13 veces menor para los serotipos -1 y -8 respectivamente comparado con el obtenido en células Caco-2 (Figura 12 y Tabla 2); ii) la fase explosión de la curva de un solo ciclo de la línea celular MA104 es de menor proporción comparado con el de las células Caco-2 (Figura 22); iii) tras la transfección de RNA viral de HAstV-8, que permite evadir las etapas de adhesión, entrada y desnudamiento del virus, se observa un rendimiento menor en las células MA104 en la producción de partículas infecciosas por célula transfectada, comparado con el rendimiento obtenido en las células Caco-2 (Tabla 5). No obstante, es importante destacar que se debe ser cuidadoso al considerar los resultados obtenidos en los experimentos de transfección de RNA viral de astrovirus, pues se pudo apreciar que la



producción de partículas virales infecciosas comparada con el rendimiento conseguido después de una infección está severamente afectada.

En las células MDCKII, existe una evidente restricción en etapas tempranas de la infección puesto que se muestran refractarias a la infección, es decir, no se infectan. Los resultados demuestran, que una vez que el RNA viral se libera al interior de la célula, la maquinaria de las células MDCKII es capaz de replicar al virus, pues se logró observar progenie viral (Tabla 5) luego de transfectar al RNA de HAsV-8; sin embargo, si se compara dicha producción de progenie viral con las otras dos líneas celulares (Caco-2 y MA104), las 7 uff producidas en células MDCKII son muy inferiores. Se puede inferir entonces que en las células MDCKII el tropismo de astrovirus se encuentra limitado en etapas tempranas de la infección y además en algún paso posterior al desnudamiento del RNA. En este caso se debe conservar la cautela al interpretar estos resultados debido al disminuido rendimiento viral posterior a la transfección de RNA viral en comparación con células infectadas.

Como conclusión global, los resultados de este trabajo indican que para las líneas celulares MA104 y MDCKII, el tropismo de astrovirus está limitada en varios pasos de su replicación, durante la entrada y en algún paso posterior a la liberación del RNA viral al citosol.



Perspectivas

- Explorar si la limitación de la infección en células MA104 se debe a una heterogeneidad en algún paso de la entrada del virus o en su replicación al interior de la célula.
- Determinar en células MA104 que fase de la etapa temprana de la infección limita la infección de los astrovirus.
- Evaluar en células MA104, qué etapa del ciclo de replicación viral limita el tropismo de astrovirus una vez que el genoma se ha liberado dentro de las células: replicación, traducción, ensamble y/o liberación de partículas.
- Explorar si después de varios pases de las clonas de MA104 se restablece el patrón de infección de la línea celular parental o el fenotipo de infección disminuido permanece estable.
- Aislar clonas MA104 que muestren una mayor permisividad que la línea celular parental.



Referencias

Aguilar-Hernández, N. (2018) *Caracterización de las interacciones tempranas de astrovirus de humano con células permisivas y resistentes a la infección*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Aguilar-Hernández, N., López, S. and Arias, C. F. (2018) 'Minimal capsid composition of infectious human astrovirus', *Virology*. Elsevier Inc., 521(May), pp. 58–61. doi: 10.1016/j.virol.2018.05.021.

Arias, C. F. and Dubois, R. M. (2017) 'The astrovirus capsid: A review', *Viruses*, 9(1), pp. 1–13. doi: 10.3390/v9010015.

Banos-Lara, M. del R. and Méndez, E. (2010) 'Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism', *Virology*. Elsevier Inc., 401(2), pp. 322–332. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.028.

Barreau, C. *et al.* (2006) 'Liposome-mediated RNA transfection should be used with caution', *RNA Journal*, 12(10), pp. 1790–1793. doi: 10.1261/rna.191706.

Bass, D. M. *et al.* (1992) 'Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus', *Journal of Clinical Investigation*, 90(6), pp. 2313–2320. doi: 10.1172/JCI116119.

Bass, D. M. and Qiu, S. (2000) 'Proteolytic Processing of the Astrovirus Capsid', *Journal of Virology*, 74(4), pp. 1810–1814. doi: 10.1128/JVI.74.4.1810-1814.2000.

Bass, D. M. and Upadhyayula, U. (1997) 'Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes', *Journal of virology*, 71(11), pp. 8666–71.

De Benedictis, P. *et al.* (2011) 'Astrovirus infections in humans and animals - Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions', *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier B.V., 11(7), pp. 1529–1544. doi: 10.1016/j.meegid.2011.07.024.



Bogdanoff, W. A. *et al.* (2017) 'Structure of a Human Astrovirus Capsid-Antibody Complex and Mechanistic Insights into Virus Neutralization', *Journal of Virology*, 91(2), pp. e01859-16. doi: 10.1128/JVI.01859-16.

Bosch, A., Pintó, R. M. and Guix, S. (2014) 'Human astroviruses', *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), pp. 1048–1074. doi: 10.1128/CMR.00013-14.

Brinker, J. P., Blacklow, N. R. and Herrmann, J. E. (2000) 'Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines', *Archives of Virology*, 145(9), pp. 1847–1856. doi: 10.1007/s007050070060.

Castro, T. X. *et al.* (2013) 'Molecular characterisation of calicivirus and astrovirus in puppies with enteritis.', *The Veterinary record*, 172(21), p. 557. doi: 10.1136/vr.101566.

Chu, D. K. W. *et al.* (2010) 'Detection of novel astroviruses in urban brown rats and previously known astroviruses in humans', *Journal of General Virology*, 91(10), pp. 2457–2462. doi: 10.1099/vir.0.022764-0.

Cortez, V. *et al.* (2017) 'Astrovirus Biology and Pathogenesis', *Annual Review of Virology*, 4(1), pp. 327–348. doi: 10.1146/annurev-virology-101416-041742.

Coto-Llerena, M. *et al.* (2017) 'Permissiveness of human hepatocellular carcinoma cell lines for hepatitis C virus entry and replication', *Virus Research*. Elsevier, 240(July), pp. 35–46. doi: 10.1016/j.virusres.2017.07.018.

Denker, B. M. and Sabath, E. (2011) 'The Biology of Epithelial Cell Tight Junctions in the Kidney', *Journal of American Society of Nephrology*, 22, pp. 622–625. doi: 10.1681/ASN.2010090922.

Diamond, M. S. *et al.* (2000) 'Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains.', *Journal of virology*, 74(17), pp. 7814–23. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10933688><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC112311>.



- Ding, Q., Von Schaewen, M. and Ploss, A. (2014) 'The impact of hepatitis C virus entry on viral tropism', *Cell Host and Microbe*. Elsevier Inc., 16(5), pp. 562–568. doi: 10.1016/j.chom.2014.10.009.
- Domann, R. and Martinez, J. (1995) 'Alternative to Cloning Cylinders for Isolation of Adherent Cell Clones', *BioTechniques*, 18(4), p. 1.
- Donelli, G. *et al.* (1992) 'Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells', *Journal of Medical Virology*, 38(4), pp. 271–277. doi: 10.1002/jmv.1890380408.
- Dong, J. *et al.* (2011) 'Crystal structure of the human astrovirus capsid spike', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), pp. 12681–12686. doi: 10.1073/pnas.1104834108.
- Dryden, K. A. *et al.* (2012) 'Immature and Mature Human Astrovirus: Structure, Conformational changes, and Similarities to Hepatitis E Virus', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 422(5), pp. 650–658. doi: 10.1016/j.jmb.2012.06.029.
- Dukes, J. D., Whitley, P. and Chalmers, A. D. (2011) 'The MDCK variety pack: Choosing the right strain', *BMC Cell Biology*. BioMed Central Ltd, 12(1), p. 43. doi: 10.1186/1471-2121-12-43.
- Emmett, S. R. *et al.* (2004) 'The Cell Cycle and Virus Infection', in Humphrey, T. and Brooks, G. (eds) *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press Inc., pp. 197–218. doi: 10.1385/1-59259-857-9:197.
- Ernesto, M. *et al.* (2012) *Replication Cycle of Astroviruses, Astrovirus Research*. Edited by S.-C. S. New York, NY: Springer. doi: 10.1007/978-1-4614-4735-1.
- Espinosa, R. *et al.* (2018) 'Isolation of Neutralizing Monoclonal Antibodies to Human Astrovirus and Characterization of Virus Variants That Escape Neutralization', *Journal of Virology*, 93(2), pp. 1–12. doi: 10.1128/jvi.01465-18.



Feuer, R. *et al.* (2002) 'Cell Cycle Status Affects Coxsackievirus Replication, Persistence, and Reactivation In Vitro', *Journal of Virology*, 76(9), pp. 4430–4440. doi: 10.1128/jvi.76.9.4430-4440.2002.

Finkbeiner, S. *et al.* (2009) 'Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses.', *Virology journal*, 6, p. 161. doi: 10.1186/1743-422X-6-161.

Finkbeiner, S. R. *et al.* (2009) 'Identification of a Novel Astrovirus (Astrovirus VA1) Associated with an Outbreak of Acute Gastroenteritis', *Journal of Virology*, 83(20), pp. 10836–10839. doi: 10.1128/JVI.00998-09.

Finkbeiner, S. R., Kirkwood, C. D. and Wang, D. (2008) 'Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea', *Virology Journal*, 5(1), p. 117. doi: 10.1186/1743-422X-5-117.

Flint, J. *et al.* (2015) *Principles of Virology*. 4th edn. Washington, DC: American Society for Microbiology PRESS.

Fuentes, C. *et al.* (2011) 'The C-Terminal nsP1a Protein of Human Astrovirus Is a Phosphoprotein That Interacts with the Viral Polymerase', *Journal of Virology*, 85(9), pp. 4470–4479. doi: 10.1128/JVI.01515-10.

Fuentes, C. *et al.* (2012) 'Identification of Human Astrovirus Genome-Linked Protein (VPg) Essential for Virus Infectivity', *Journal of Virology*, 86(18), pp. 10070–10078. doi: 10.1128/JVI.00797-12.

Gabbay, Y. B. *et al.* (2007) 'Molecular epidemiology of astrovirus type 1 in Belém, Brazil, as an agent of infantile gastroenteritis, over a period of 18 years (1982-2000): Identification of two possible new lineages', *Virus Research*, 129(2), pp. 166–174. doi: 10.1016/j.virusres.2007.07.006.

Geigenmüller, U. *et al.* (2002) 'Processing of Nonstructural Protein 1a of Human Astrovirus', *Journal of Virology*, 76(4), pp. 2003–2008. doi: 10.1128/JVI.76.4.2003.



Geigenmüller, U., Ginzton, N. H. and Matsui, S. M. (2002) 'Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells', *Journal of General Virology*, 83(7), pp. 1691–1695. doi: 10.1099/0022-1317-83-7-1691.

Geigenmüller, U., Méndez, E. and Matsui, S. M. (2003) 'Studies on the molecular biology of human astrovirus', in Desselberger, J. and Gray, J. (eds) *Perspectives in medical virology*. Amsterdam: Elsevier Ltd, pp. 573–586. doi: 10.1016/S0168-7069(03)09034-7.

De Grazia, S. *et al.* (2016) 'Temporal variation in the distribution of type-1 human astrovirus lineages in a settled population over 14 years', *Archives of Virology*, 161(6), pp. 1633–1637. doi: 10.1007/s00705-016-2798-7.

Guix, S. *et al.* (2004) 'Apoptosis in astrovirus-infected CaCo-2 cells', *Virology*, 319(2), pp. 249–261. doi: 10.1016/j.virol.2003.10.036.

Guix, S. *et al.* (2005) 'Human astrovirus C-terminal nsP1a protein is involved in RNA replication', *Virology*, 333(1), pp. 124–131. doi: 10.1016/j.virol.2004.12.023.

Guix, S. *et al.* (2007) 'Norwalk Virus RNA Is Infectious in Mammalian Cells', *Journal of Virology*, 81(22), pp. 12238–12248. doi: 10.1128/JVI.01489-07.

Guix, S. *et al.* (2015) 'Type I interferon response is delayed in human astrovirus infections', *PLoS ONE*, 10(4), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0123087.

Hoshino, Y. *et al.* (1981) 'Detection of Astroviruses in Feces of a Cat with Diarrhea', *Archives of Virology*, 70, pp. 373–376.

Hou, W. *et al.* (2017) 'Determination of the Cell Permissiveness Spectrum, Mode of RNA Replication, and RNA-Protein Interaction of Zika Virus', *BMC Infectious Diseases*. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12879-017-2338-4.

Jiang, B. *et al.* (1993) 'RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(22), pp. 10539–10543. doi: 10.1073/pnas.90.22.10539.



- Johnson, C. *et al.* (2017) 'Astrovirus Pathogenesis', *Viruses*, 9(1), p. 22. doi: 10.3390/v9010022.
- Jonassen, C. M. *et al.* (2003) 'Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: Comparison with related viruses', *Virus Research*, 91(2), pp. 195–201. doi: 10.1016/S0168-1702(02)00269-1.
- Jonassen, C. M., Jonassen, T. and Grinde, B. (1998) 'A common RNA motif in the 3' end of the genomes of astroviruses, avian infectious bronchitis virus and an equine rhinovirus', *Journal of General Virology*, 79(4), pp. 715–718. doi: 10.1099/0022-1317-79-4-715.
- Kang, G. and Gray, J. J. (2013) 'Astroviruses', *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease*, pp. 286–288. doi: 10.1016/B978-1-4160-4390-4.00177-6.
- Kapoor, A. *et al.* (2009) 'Multiple novel astrovirus species in human stool', *Journal of General Virology*, 90(12), pp. 2965–2972. doi: 10.1099/vir.0.014449-0.
- Kiang, D. and Matsui, S. M. (2002) 'Proteolytic processing of a human astrovirus nonstructural protein', *The Journal of general virology*, 83(Pt 1), pp. 25–34. doi: 10.1128/JVI.76.4.2003.
- Kim, H. S. *et al.* (1993) 'Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line', *Archives of Virology*, 133(3–4), pp. 477–483. doi: 10.1007/BF01313785.
- Koci, M. D., Seal, B. S. and Schultz-Cherry, S. (2000) 'Molecular characterization of an avian astrovirus', *Journal of virology*, 74(13), pp. 6173–7. doi: 10.1128/JVI.74.13.6173-6177.2000.
- Kramer, B. *et al.* (1997) 'Chinese hamster ovary cells are non-permissive towards infection with coxsackievirus B3 despite functional virus-receptor interactions', *Virus Research*, 48(2), pp. 149–156. doi: 10.1016/S0168-1702(96)01438-4.



Kreutz, L. C. (1998) 'Cellular membrane factors are the major determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus tropism', *Virus Research*, 53(2), pp. 121–128. doi: 10.1016/S0168-1702(97)00134-2.

Krishna, N. K. (2005) 'Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology', *Viral immunology*, 18(1), pp. 17–26. doi: 10.1089/vim.2005.18.17.

Li, I. W. S. *et al.* (2009) 'Differential susceptibility of different cell lines to swine-origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1, and avian influenza A H5N1 viruses', *Journal of Clinical Virology*, 46(4), pp. 325–330. doi: 10.1016/j.jcv.2009.09.013.

Londrigan, S. L. *et al.* (2000) 'Growth of rotaviruses in continuous human and monkey cell lines that vary in their expression of integrins', *Journal of General Virology*, 81(9), pp. 2203–2213. doi: 10.1099/0022-1317-81-9-2203.

Lozach, P. Y. *et al.* (2005) 'Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals', *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), pp. 23698–23708. doi: 10.1074/jbc.M504337200.

Marczinke, B. *et al.* (1994) 'The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting.', *Journal of virology*, 68(9), pp. 5588–95.

Available

at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8057439><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC236959>.

Martella, V. *et al.* (2011) 'Astroviruses in rabbits', *Emerging Infectious Diseases*, 17(12), pp. 2287–2293. doi: 10.3201/eid1712.110967.

Marvin, S. A. *et al.* (2016) ' Type I Interferon Response Limits Astrovirus Replication and Protects against Increased Barrier Permeability In Vitro and In Vivo ', *Journal of Virology*, 90(4), pp. 1988–1996. doi: 10.1128/jvi.02367-15.



Masuda, K., Kajikawa, A. and Igimi, S. (2010) 'Establishment and Evaluation of an in vitro M Cell Model using C2BBel Cells and Raji Cells', *Bioscience and Microflora*, 30(2), pp. 37–44. doi: 10.12938/bifidus.30.37.

Matrosovich, M. N. *et al.* (2004) 'Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium', *Journal of Virology*, 78(22), pp. 12665–12667. doi: 10.1128/JVI.78.22.12665-12667.2004.

Mendenhall, I. H., Smith, G. J. D. and Vijaykrishna, D. (2015) 'Ecological Drivers of Virus Evolution: Astrovirus as a Case Study', *Journal of Virology*, 89(14), pp. 6978–6981. doi: 10.1128/jvi.02971-14.

Méndez, E. *et al.* (2002) 'Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein.', *Journal of virology*, 76(16), pp. 7996–8002. doi: 10.1128/JVI.76.16.7996.

Méndez, E. *et al.* (2003) 'Protein Products of the Open Reading Frames Encoding Nonstructural Proteins of Human Astrovirus Serotype 8', *Journal of Virology*, 77(21), pp. 11378–11384. doi: 10.1128/JVI.77.21.11378.

Méndez, E. *et al.* (2007) 'Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis.', *Journal of virology*, 81(19), pp. 10649–58. doi: 10.1128/JVI.00785-07.

Méndez, E. *et al.* (2014) 'Characterization of Human Astrovirus Cell Entry', *Journal of Virology*, 88(5), pp. 2452–2460. doi: 10.1128/JVI.02908-13.

Méndez, E. and Arias, C. F. (2013) 'Astroviruses', in Knipe, D. M. *et al.* (eds) *Fields virology*. 6th edn. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, pp. 609–629.

Méndez, E., Salas-Ocampo, E. and Arias, C. F. (2004) 'Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses.', *Journal of virology*, 78(16), pp. 8601–8. doi: 10.1128/JVI.78.16.8601-8608.2004.



Mirabelli, C. and Wobus, C. E. (2018) 'All Aboard! Enteric Viruses Travel Together', *Cell Host and Microbe*. Elsevier Inc., 24(2), pp. 183–185. doi: 10.1016/j.chom.2018.07.012.

Monroe, S. S. *et al.* (1993) 'Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses.', *Journal of virology*, 67(6), pp. 3611–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8497068> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC237710>.

Moser, L. A., Carter, M. and Schultz-Cherry, S. (2007) 'Astrovirus Increases Epithelial Barrier Permeability Independently of Viral Replication', *Journal of Virology*, 81(21), pp. 11937–11945. doi: 10.1128/JVI.00942-07.

Moser, L. A. and Schultz-Cherry, S. (2008) 'Suppression of astrovirus replication by an ERK1/2 inhibitor.', *Journal of virology*, 82(15), pp. 7475–82. doi: 10.1128/JVI.02193-07.

Olortegui, M. P. *et al.* (2018) 'Astrovirus Infection and Diarrhea in 8 Countries.', *Pediatrics*, 141(1), p. e20171326. doi: 10.1542/peds.2017-1326.

Pantin-Jackwood, M. J. *et al.* (2011) 'Molecular characterization of avian astroviruses', *Archives of Virology*, 156(2), pp. 235–244. doi: 10.1007/s00705-010-0849-z.

Platts-Mills, J. A. *et al.* (2015) 'Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: A multisite birth cohort study (MAL-ED)', *The Lancet Global Health*, 3(9), pp. e564–e575. doi: 10.1016/S2214-109X(15)00151-5.

Quan, P. L. *et al.* (2010) 'Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia', *Emerging Infectious Diseases*, 16(6), pp. 918–925. doi: 10.3201/eid1606.091536.

Rivera, R. *et al.* (2010) 'Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals', *Journal of General Virology*, 91(1), pp. 166–173. doi: 10.1099/vir.0.015222-0.



- Sainz, B. *et al.* (2012) 'Permissiveness of human hepatoma cell lines for HCV infection', *Virology Journal*, 9, pp. 1–16. doi: 10.1186/1743-422X-9-30.
- Sanchez-Fauquier, A. *et al.* (1994) 'Characterization of a Human Astrovirus Serotype 2 Structural Protein (VP26) That Contains an Epitope Involved in Virus Neutralization', *Virology*, pp. 312–320. doi: 10.1006/viro.1994.1296.
- Speroni, S. *et al.* (2009) 'Structural and Biochemical Analysis of Human Pathogenic Astrovirus Serine Protease at 2.0 Å Resolution', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 387(5), pp. 1137–1152. doi: 10.1016/j.jmb.2009.02.044.
- Toh, Y. *et al.* (2016) 'Crystal Structure of the Human Astrovirus Capsid Protein', *Journal of Virology*, 90(20), pp. 9008–9017. doi: 10.1128/JVI.00694-16.
- Velázquez-Moctezuma, R. *et al.* (2011) 'Alternative cell lines to improve the rescue of infectious human astrovirus from a cDNA clone', *Journal of Virological Methods*, 179(2), pp. 295–302. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.11.005.
- Volpe, D. A. (2008) 'Variability in Caco-2 and MDCK Cell-Based Intestinal Permeability Assays', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(2), pp. 712–725. doi: 10.1002/jps.
- Vu, D.-L. *et al.* (2016) 'Novel human astroviruses: Novel human diseases?', *Journal of Clinical Virology*. Elsevier, 82, pp. 56–63. doi: 10.1016/J.JCV.2016.07.004.
- Vu, D.-L. *et al.* (2017) 'Epidemiology of Classic and Novel Human Astrovirus: Gastroenteritis and Beyond', *Viruses*, 9(2), p. 33. doi: 10.3390/v9020033.
- Walter, E. and Kissel, T. (1995) 'Heterogeneity in the human intestinal cell line Caco-2 leads to differences in transepithelial transport', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3, pp. 215–230. doi: 10.1016/0928-0987(95)00010-B.
- Walter, J. E. *et al.* (2001) 'Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children', *Archives of Virology*, 146(12), pp. 2357–2367. doi: 10.1007/s007050170008.



Wang, Y. *et al.* (2013) 'Recently identified novel human astroviruses in children with diarrhea, China', *Emerging Infectious Diseases*, 19(8), pp. 1333–1335. doi: 10.3201/eid1908.121863.

Wohlgemuth, N., Honce, R. and Schultz-Cherry, S. (2019) 'Astrovirus evolution and emergence', *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier, 69(January), pp. 30–37. doi: 10.1016/j.meegid.2019.01.009.

Xavier, M. D. P. T. P. *et al.* (2015) 'Surveillance of human astrovirus infection in Brazil: The first report of MLB1 astrovirus', *PLoS ONE*, 10(8), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0135687.

York, R. L. *et al.* (2016) 'Structural, Mechanistic, and Antigenic Characterization of the Human Astrovirus Capsid.', *Journal of virology*, 90(5), pp. 2254–63. doi: 10.1128/JVI.02666-15.

Zhao, W. *et al.* (2011) 'Complete sequence and genetic characterization of pigeon avian nephritis virus, a member of the family Astroviridae', *Archives of Virology*, 156(9), pp. 1559–1565. doi: 10.1007/s00705-011-1034-8.