



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

28  
2e.  
FACULTAD DE QUIMICA  
MEXICO, D.F.

FACULTAD DE QUIMICA

NUMERACION MAL COMPAGINADA.

CARACTERIZACION DE LA UNION DE DISTINTAS  
CEPAS DE ROTAVIRUS A SU CELULA HUESPED

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
Q U I M I C A  
P R E S E N T A :  
CLAUDIA SELENE ZARATE GUERRA



MEXICO, D. F.



263400

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

1998



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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


Jurado asignado:

Presidente	Prof. Agustín López-Munguía Canales
Vocal	Prof. Homero Hernández Montes
Secretario	Profa. Susana López Charretón
1er. Suplente	Prof. José Pedraza Chaverri
2do. Suplente	Profa. Ana María Pasapera Limón

Este trabajo se desarrolló en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor

Sustentante

  
Dra. Susana López Charretón

  
Claudia Selene Zárate Guerra

Agradezco a la Dra Susana López Charretón por su apoyo y su dirección en este trabajo y por la oportunidad que me dio de incorporarme a su grupo de investigación.

También agradezco al Dr Carlos Arias por los comentarios, las dudas y el apoyo que me brindó durante la realización de este trabajo.

**A mis padres y a mi hermano**

**A Susana y Carlos**

***A mis amigos, a los que son y a los que se quedaron en el camino***

**A mis compañeros de laboratorio, cuyo número será siempre un enigma**

# INDICE

I. RESUMEN.....	1
II INTRODUCCION.....	2
II.1 Generalidades.....	2
II.2 Proteínas virales. ....	3
II.3 Entrada de la virus a la célula. ....	7
III. MATERIALES Y METODOS.....	9
III.1 Cultivo de las células.....	9
III.2. Infección de células.....	9
III.3 Semipurificación de virus.....	9
III.4 Titulación de virus. ....	10
III.5 Ensayo de infectividad, en presencia de las proteínas recombinantes. ....	10
III.6 Ensayo de Inmunotinción.....	11
III.7 Ensayo de Unión de Virus a la Célula.....	11
III.8 Modificaciones al protocolo de Unión. ....	13
III.9 ELISA.....	13
III.10 Proteínas. ....	14
III.11 Purificación de las proteínas de fusión por afinidad.....	15
III.12 Geles de poliacrilamida-SDS.....	16
III.13 SOLUCIONES.....	16
III.14 ANTICUERPOS.....	18
IV. RESULTADOS.....	20
IV.1 Unión de virus a la célula. ....	20
IV.2 Especificidad de unión. ....	24
IV.3 Unión de proteínas virales recombinantes.....	26

IV.4 Competencia por los sitio de unión. ....	31
IV.5 Efecto en la infectividad de las proteínas virales.....	32
V. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	34
VI. PERSPECTIVAS.....	38
VII. BIBLIOGRAFIA.....	40

## I. RESUMEN

Los rotavirus son el principal agente etiológico causante de diarrea severa en niños de pequeños, provocando alrededor de 870,000 muertes al año en todo el mundo.

Las partículas virales tienen un diámetro de 75 nm y están formados por tres capas concéntricas de proteínas. Esta cápside protéica envuelve al genoma que está constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena. La capa externa está formada por dos proteínas: VP7 que forma una superficie lisa y VP4 que se proyecta formando espículas desde la superficie del virión. La proteína VP4 es susceptible a ser cortada con tripsina, generando dos polipéptidos VP8 y VP5; este corte específico está relacionado con la infectividad de los rotavirus.

En este trabajo se estudió el mecanismo por el cual los rotavirus se unen a su célula huésped, analizando el papel que juegan tanto VP8 como VP5. Para ello se utilizaron dos cepas de rotavirus: RRV, un rotavirus de origen animal, cuya unión a la célula depende de la presencia de ácido siálico sobre la superficie de ésta y Nar, un mutante de origen animal, derivado de RRV, cuya infectividad es independiente de la presencia de ácido siálico en la superficie de las células.

Se encontró que los anticuerpos dirigidos contra el polipéptido VP8 inhiben la unión de RRV a células MA104, pero no así la unión de Nar; y ocurre lo mismo si se compete la unión del virus a la célula utilizando la proteína fusión GST-VP8. Por otro lado anticuerpos contra el polipéptido VP5 inhiben la unión del virus Nar a la célula, mientras que no ocurre esto con el virus RRV. Al competir la unión de los virus con la proteína de fusión GST-VP5 se observó que solo bloquea la unión de Nar y no la de RRV.

El efecto que tiene la presencia de estas proteínas en la infectividad de los virus es el mismo que se observa en el evento de unión. Con ello se prueba que no sólo existe diferencia en la molécula a la que se unen los virus en la célula, sino que los virus RRV y Nar utilizan diferentes sitios de la proteína VP4 para unirse a la célula: RRV utiliza VP8, mientras que Nar usa la región correspondiente a VP5.



## II. INTRODUCCION

### II.1 Generalidades

Estudios epidemiológicos han demostrado que los rotavirus son el agente etiológico más importante de gastroenteritis viral en niños menores de cinco años. Las enfermedades diarreicas son el padecimiento más común en niños en todo el mundo, pero adquieren una especial importancia en los países subdesarrollados donde este tipo de enfermedades son la primera causa de mortalidad infantil. (8)

Los rotavirus estan clasificados como integrantes de la familia Reoviridae. Dentro de las características más sobresalientes de estos virus están que:

La partícula madura tiene un diámetro de aproximadamente 75 nm y posee una cápside icosaédrica constituida por tres capas concéntricas de proteínas. La capa externa esta formada por las proteínas VP4 y VP7, que pueden ser removidas del virión por agentes quelantes como el EDTA, mientras que la capa intermedia, formada por la proteína VP6 puede ser separado por agentes caotrópicos como el cloruro de calcio. El core del virus envuelve al genoma, y está formado por las proteínas VP 1, 2 y 3.

El genoma viral contiene 11 segmentos de RNA de doble cadena, que codifican tanto para las seis proteínas estructurales como para cinco proteínas no estructurales, que no se encuentran presentes en el virus maduro, pero que son necesarias durante el ciclo de replicación del virus. Las partículas virales contienen una RNA polimerasa RNA- dependiente que les permite producir transcritos de RNA que pueden ser traducidos en la célula durante la infección. El genoma por si mismo no es infeccioso, pues la partícula viral contiene las enzimas necesarias para la producción de RNA mensajero y para la replicación del genoma viral, ya que no puede utilizar las enzimas celulares para llevar a cabo su ciclo replicativo puesto que el genoma de este virus, como se mencionó anteriormente, es de RNA de doble cadena. (3)

## II.2 Proteínas Virales.

Las propiedades de las proteínas no estructurales, NSP1, NSP2, NSP3 y NSP5 no han sido muy estudiadas, sin embargo se sabe que tienen la capacidad de unirse al RNA viral y se ha observado que forman parte de las partículas subvirales, por lo que se piensa que pueden funcionar como chaperonas en el complejo de replicación, para transportar RNAs o proteínas a los sitios de replicación del RNA y de ensamblaje, o para ayudar a empacar el genoma viral (3).

En la figura 1 (15) se muestra una criomicroscopía electrónica de un rotavirus en la que se indican las posiciones relativas de las proteínas estructurales del virus.

Las proteínas que forman el core del virus VP1, VP2 y VP3 han sido poco caracterizadas, pero se sabe que el complejo de estas tres proteínas funciona como la RNA polimerasa RNA-dependiente del virus, que lleva a cabo tanto la transcripción como la replicación del genoma viral. La proteína VP1 contiene cuatro regiones estructurales que también se han descrito en todas las RNA polimerasas RNA-dependientes, lo que sugiere que esa podría ser su función. Se ha demostrado que la proteína VP2, que es la segunda proteína más abundante del virión, es capaz de unirse al RNA y formar la cápside más interna o core del virus. Se ha reportado que la proteína VP3 tiene actividad de guaniltransferasa. (3)

VP6 es la proteína más abundante en el virion, tiene un peso aproximado de 43 kDa, y es muy importante estructuralmente ya que interacciona con la capa externa y con el core. Las partículas que han perdido la capa externa y tienen expuesta la proteína VP6 no son infecciosas aunque conservan la actividad de transcriptasa. La ausencia de VP6 resulta en una pérdida de la actividad de transcriptasa, y aunque no se sabe aún cual es el papel directo que desempeña en este proceso, se ha sugerido que juega un papel estructural, no catalítico.(6)

De las dos proteínas que forman la capa más externa del virus, VP7 es una glicoproteína de 35 kDa que contiene determinantes antigénicos. La glicosilación de esta proteína ocurre simultáneamente a la traducción, así como su inserción en la membrana del retículo endoplásmico, esta inserción es

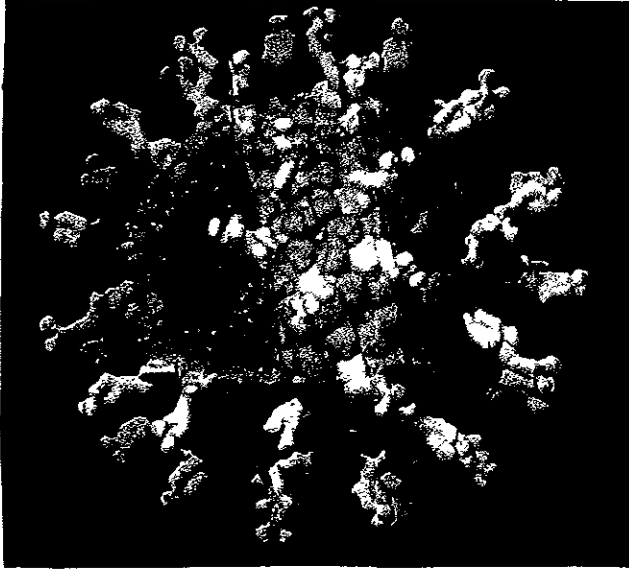


Fig. 1 Criomicroscopía electrónica de rotavirs. En amarillo se observan las espículas de VP4. En azul la cápside externa formada por VP7. En rosa la cápside interna formada por VP6. En rojo se muestra el core del virus constituido por la proteína VP2. Las proteínas VP1 y VP3 que no se muestran en esta criomicroscopía se encuentran dentro del "core" formado por VP2, en asociación con el RNA viral.

dirigida por una señal que se encuentra en la región amino terminal de VP7. El sitio en el que se sintetiza y procesa VP7 es exclusivamente el retículo endoplásmico (3). El papel de VP7 durante las primeras interacciones del virus con la célula no es claro, aunque se ha demostrado que es capaz de modular algunos de los fenotipos virales mediados por VP4, incluyendo el de unión al receptor (13).

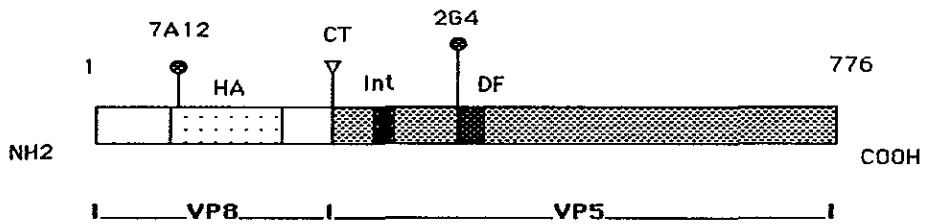
VP4 es una proteína de 88 kDa que es codificada por el segmento 4 del genoma viral, es una proteína no glicosilada de capa externa que se encuentra estructurada en forma de dímeros, los cuales forman espículas que se proyectan desde la superficie del virus.

La proteína VP4 tiene funciones muy importantes en el ciclo viral, que incluyen la unión al receptor celular y la penetración a la célula huésped. Esta proteína es también la hemaglutinina viral y es responsable de la interacción del virus con ácido siálico. La infectividad de los rotavirus aumenta y muy probablemente depende del tratamiento proteolítico del virus con tripsina (1). Este tratamiento proteolítico resulta en un rompimiento específico de VP4 en dos polipéptidos de menor peso molecular llamados VP8 (aa 1- 231) y VP5 (aa 247-776) . Se han identificado tres sitios susceptibles de corte para la tripsina en VP4, en las argininas 231, 241 y 247, estos sitios de corte se encuentran conservados en todas las cepas de rotavirus hasta ahora analizadas. El corte proteolítico de VP4 con tripsina no afecta la unión del virus a su célula huésped y mas bien ha sido asociado con la capacidad de penetración del virus hacia el citoplasma .

También en VP4 se ha descrito que existe una región hidrofóbica ( entre los aa 383-404) que guarda cierta homología con los péptidos de fusión de las proteínas de los virus Semliki Forest y Sindbis. Además, se ha propuesto que esta región pudiera tener el papel de péptido de fusión en los rotavirus, lo que ayudaría en parte, a explicar el mecanismo de entrada de estos virus, sin embargo esta hipótesis no ha sido demostrada. (11)

En la figura 2 se muestra una representación esquemática de la proteína VP4 y algunas de sus características más sobresalientes.

# VP4



HA = dominio de hemaglutinación aa 98-203  
CT = sitio de corte con tripsina Arg 231, 241, 247.  
Int = ligando de integrinas aa 307-309  
DF = dominio de fusión aa 383- 404

Fig. 2 . Mapa de VP4. Se muestran los dos polipéptidos VP8 y VP5 y los sitios de corte con tripsinas que los originan. Los dominios asignados más relevantes: hemaglutinación, sitio putativo de fusión y el receptor de integrinas. También se muestran los sitios de mapeo de los anticuerpos utilizados.

### II.3 Entrada de los virus a la célula.

Para que los virus animales infecten a su célula huésped es necesario que trasladen su material genético al interior de ésta; los virus que tienen una membrana lipídica pueden entrar a la célula mediante la fusión de su cubierta lipídica con la membrana celular. Los virus que no poseen esta cubierta lipídica pueden entrar por endocitosis o por penetración directa.

En el caso de los rotavirus no se ha podido dilucidar cuál es el mecanismo a través del cual el virus llega al interior de la célula. Se ha observado que los virus que son internados por vía de endocitosis no dan lugar a una infección productiva (7).

La unión del virus a la célula se lleva a cabo a 4°C, sin embargo el virus no es internado a esta temperatura, lo que sugiere que para ello es necesario que los procesos celulares estén activos (9). Varios estudios han demostrado que la entrada del virus a la célula depende del tratamiento previo con tripsina. (4). aparentemente los virus pre-tratados con tripsina entran al citoplasma por penetración directa de la célula a través de la membrana al citoplasma. Por otro lado las partículas no tratadas con tripsina son endocitadas y transportadas a los lisosomas, sin dar lugar a una infección productiva . (7)

La unión de la mayoría de los rotavirus de origen animal a la célula huésped, así como la capacidad de estas cepas virales de aglutinar eritrocitos es dependiente de la presencia de ácido siálico (AS) en la superficie de la célula (10). El tratamiento de los eritrocitos o de las células con sialidasas, que remueven los ácido siálico de la superficie de las células, resulta en la inhibición de la hemaglutinación, o en la inhibición de la unión del virus a la superficie celular, con la consecuente inhibición de la infectividad.

Se ha sugerido que el receptor para los rotavirus de origen animal es una molécula que contiene ácido siálico, en contraste con los rotavirus que infectan humanos, cuya infectividad es independiente de la presencia de estas moléculas en la superficie de la célula

Se ha demostrado que el dominio responsable de la unión a ácido siálico en los rotavirus de origen animal, reside en el polipéptido VP8 (5), que representa el primer tercio amino terminal de VP4

(Fig 2). Más recientemente se ha demostrado que los aminoácidos 155, 188 y 190 son algunos de los aminoácidos que podrían interactuar directamente con el ácido siálico (6).

Recientemente aislamos en nuestro laboratorio variantes de un rotavirus de simio (cepa RRV) que son capaces de infectar eficientemente a células tratadas con neuraminidasa (una sialidasa), indicando que la unión a ácido siálico no representa un paso esencial en la infección de rotavirus de origen animal a células epiteliales en cultivo (12). La caracterización de estas variantes mostró que retienen su capacidad de unión a ácido siálico, pero a diferencia de la cepa parental, estos variantes, que hemos llamado Nar, son capaces de interactuar directamente con las células tratadas con neuraminidasa a través de un receptor celular que no contiene ácido siálico. El análisis genético de estas mutantes mostró que esa interacción, independiente de ácido siálico, es mediada por VP4, a través de un sitio en la proteína viral diferente de su dominio de unión a ácido siálico (13). Estos hallazgos mostraron que existen cuando menos dos dominios de la proteína VP4 de la cepa RRV que interactúan con la célula durante la infección viral, uno dependiente y el otro independiente de ácido siálico.

La primera interacción es aquella que depende de la presencia de ácido siálico y es probable que sea inespecífica y no esté involucrada en el proceso de entrada del virus a la célula, pero tal vez facilita una segunda interacción que permite la infección. Esto explicaría porque muchas líneas celulares permiten la unión de rotavirus a su membrana, pero no son susceptibles de ser infectadas. (3).

El objetivo de este trabajo consistió en localizar y caracterizar esos dos dominios de unión en la proteína VP4.

Dado que en los rotavirus silvestres de origen animal el sitio de unión a ácido siálico en VP4 media la interacción inicial entre el virus y la célula huésped, a través de un receptor que contiene ácido siálico. Como hipótesis de trabajo proponemos que, después de este evento inicial el sitio de unión independiente de ácido siálico en VP4, media una segunda interacción con un receptor resistente a neuraminidasa. Creemos que los variantes de RRV tienen el sitio de unión independiente a ácido siálico ya expuesto para interactuar directamente con el segundo receptor (independiente de ácido siálico), obviando la primera interacción con ácido siálico.(Fig 11)

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **III.1 Cultivo de las células**

Se utilizan las células MA104 crecidas en monocapa en frascos de cultivo utilizando medio MEM (Minimum Essential Medium), suplementado con 9% de suero fetal bovino, a 37 °C y en un ambiente húmedo con 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### **III.2 Infección de las células.**

- 1.- Activar el lisado viral con tripsina estéril al 1 % y se lleva a una concentración final de 10 µg de tripsina por mL de lisado.
- 2.- Incubar durante 30 minutos a 37 °C.
- 3.- Agregar el lisado activado a frascos de células MA104 confluentes e incubar 1 h a 37 °C.
- 4.- Retirar el inóculo.
- 5.- Agregar medio MEM sin suero.
- 6.- Incubar a 37 °C hasta que se observe efecto citopático total (aproximadamente 36 horas).
- 7.- Congelar a -70 °C.

#### **III.3 Semipurificación del virus.**

- 1.- Descongelar el lisado viral y centrifugar durante una hora a 140 000 g, en el rotor SW28 de la ultracentrífuga Beckman L8-55M.
- 2.- Resuspender la pastilla en el buffer TMSC y extraer 3 veces con Freón (trifluoro, tricloroetano), en el rotor 16F6-38 de la centrífuga eppendorf 5403, durante cinco minutos a 5 500 g.



3.- Pasar la fase acuosa a través de un colchón de sacarosa de 0.5 mL, (sacarosa al 37% en TMSC) centrifugando 20 minutos a 400 000 g, en el rotor TLA100.4 de la ultracentrífuga TLX de Beckman.

4.- Resuspender la pastilla en TMSC.

5.- Cuantificar y titular los virus obtenidos.

#### **III.4 Titulación de los virus.**

1.- Crecer células MA104 en placas de 96 pozos a que formen una monocapa confluyente.

2.- Activar los lisados de virus con tripsina durante 30 min a 37 °C. Hacer diluciones seriadas de los virus en MEM sin suero.

3.- Lavar las células con MEM sin suero, y añadir 50 µL/pozo de las diferentes diluciones de los virus e incubar durante 60 min a 37 °C.

4.- Lavar la placa dos veces con MEM sin suero e incubar de 12 a 16 h a 37 °C en MEM sin suero.

5.- Fijar las células e inmunotefir.

6.- La infectividad del virus es reportada como unidades formadoras de focos peroxidados (ffu) por mL.

#### **III.5 Ensayo de infectividad, en presencia de las proteínas recombinantes.**

1.- Crecer células MA104 en placas de 96 pozos a que formen una monocapa confluyente.

2.- Lavar las células con MEM sin suero, e incubar durante media hora a 4 °C con 30 µL de las diferentes diluciones de las proteínas recombinantes.

3.- Agregar 30 µl de virus RRV o Nar (aproximadamente 200 ffu por pozo). Incubar durante media hora a 4 °C.

4.- Lavar la placa dos veces con MEM sin suero e incubar de doce a catorce horas a 37 °C en MEM sin suero.

5.- Fijar las células e inmunoteñir.

6.- La infectividad del virus es reportada como porcentaje de ffu (unidades formadoras de focos) presentes en el ensayo con respecto a las células que no fueron preincubadas con las proteínas.

### **III.6 Ensayo de Inmunotinción**

1.- Este ensayo se realiza sobre las células infectadas del protocolo anterior.

2.- Fijar las células con acetona 80 % en PBS, a temperatura ambiente, durante 30 minutos.

3.- Lavar dos veces con PBS.

4.- Añadir el anticuerpo RoR (suero anti-rotavirus hecho en conejo) diluido 1:1000 en PBS.

5.- Incubar una hora a 37 °C.

6.- Lavar dos veces y agregar proteína A peroxidasa (Kierdergaard & Perry) diluida 1:2500.

7.- Incubar 1 h a 37 °C.

8.- Lavar dos veces con PBS.

9.- Añadir el sustrato de peroxidasa (ver más adelante).

10.- Incubar a temperatura ambiente hasta que las células se tiñan, observando frecuentemente al microscopio.

11.- Lavar dos veces con agua.

12.- Observar al microscopio y contar el número de células inmunoteñidas.

### **III.7 Ensayo de unión del virus a la célula.**

a) Preparación de las células:

1.- Sembrar células MA104 en frascos de 162 cm<sup>2</sup> (F165) y esperar a que se forme una monocapa confluyente. (2 a 3 días).

2.- Despegar las células del frasco F165 utilizando 6 mL de EDTA 50 mM en PBS (sin calcio y sin magnesio) a 37 °C.

3.- Centrifugar las células durante 1 min a 2000 g, a 4°C en el rotor 16A4-44 de la centrífuga eppendorf 5403

4.- Lavar 2 veces con MEM sin suero

5.- Resuspender en MEM, contar las células previamente teñidas con azul de tripano y un hematocitómetro y ajustar a una densidad de 10<sup>6</sup> células/mL, con MEM sin suero.

#### b) Preparación de los virus.

1.-Diluir el virus semipurificado a la concentración deseada con MEM sin suero y sonicar 3 veces durante 20 s, a 4 °C.

2.- Centrifugar 3 min a 11 000 g en la centrífuga eppendorf y utilizar el sobrenadante para los ensayos de unión.

#### c) Preparación de las proteínas y de los anticuerpos.

1.- Hacer las diluciones requeridas en MEM sin suero y mantener en hielo hasta que se utilicen.

#### d) Ensayo de unión .

1.- Mezclar en un tubo eppendorf de 1.5 mL :

50 µL de células (1 X 10<sup>6</sup> cel/mL)

50 µl de 4% de BSA (seroalbumina bovina) en PBS.

100 µl de la dilución de virus o proteína.

2.- Incubar esta mezcla durante una hora a 4 °C con agitación.

- 3.- Centrifugar 1 minuto a 4 500 g en la centrifuga eppendorf.
- 4.- Retirar el sobrenadante y lavar 2 veces con 50  $\mu$ l de 0.5 % BSA en PBS.
- 5.- Cambiar la suspensión de células a un tubo eppendorff nuevo.
- 6.- Centrifugar las células a 4 500 g durante 1 minuto en la centrífuga, retirar el sobrenadante.
- 7.- Resuspender el paquete celular en 50  $\mu$ L de Tritón X-100 al 0.1 % y colocar la muestra en una placa de ELISA, previamente sensibilizada (ver más adelante).

### **III.8 Modificaciones al protocolo de Unión.**

#### a) Unión de los virus en presencia de las proteínas.

- 1.- Preincubar las células (50  $\mu$ L) durante 60 minutos a 4 °C con agitación con 100  $\mu$ L de diferentes concentraciones de proteínas: 30, 15, 7.5 y 3.75 ng/ $\mu$ L.
- 2.- Lavar 1 vez con 0.5 % BSA y resuspender las células en 50  $\mu$ L de MEM sin suero.
- 3.- Agregar 50  $\mu$ L de 4% BSA y 100  $\mu$ L de virus e incubar durante una hora a 4 °C como el protocolo general.

#### b) Unión de los virus en presencia de anticuerpos.

- 1.- Después de sonicar los virus, incubar durante 1 h a temperatura ambiente con diferentes diluciones de los anticuerpos.
- 2.- Incubar con las células siguiendo el protocolo general.

### **III.9 ELISA**

El ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) es un ensayo inmunoenzimático que se utiliza para detectar la cantidad de virus que se ha unido a las células, con el siguiente protocolo:

- 1.- Sensibilizar la placa de ELISA con 50 $\mu$ L/pozo del anticuerpo policlonal  $\alpha$ 930 (suero de cabra anti-rotavirus) diluido 1:5000 en PBS. Incubar la placa 2 h a 37 °C. Lavar 2 veces con PBS
- 2.- Bloquear la placa con 200 $\mu$ L/pozo de 1% BSA en PBS. Incubar 2 hr a 37 °C. Lavar 2 veces con PBS.
- 3.- Colocar la muestra problema e incubar 1 hora a 37 °C. Lavar dos veces con PBS.
- 4.- Agregar 50  $\mu$ L/pozo del anticuerpo policlonal  $\alpha$ YM (suero de conejo anti-rotavirus YM) diluido 1:2500, incubar durante 1 h a 37 °C. Lavar 2 veces con PBS
- 5.- Agregar 50  $\mu$ L/pozo del anticuerpo  $\alpha$ IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Kirkegaard & Perry) diluido 1: 1300, e incubar 1 hora a 37 °C. Lavar 3 veces con PBS
- 6.- Agregar el sustrato de la enzima, Sigma I04, disuelto en 5 mL de buffer de dietanolamina, e incubar a 37 °C hasta que desarrolle color.
- 7.- Leer a una absorbancia de 405 nm.

### III.10 Proteínas.

En este trabajo se utilizaron las proteínas de fusión GST-VP8, GST-VP5 y como control la proteína Glutación S-transferasa (GST), que fueron obtenidas en bacterias *E. coli*, a partir del sistema de expresión del vector pGEX. La proteína GST-VP8 consiste en la fusión de la proteína Glutación S-transferasa con los aminoácidos 1 a 247 de la proteína VP4 de rotavirus de simio RRV. En la fusión GST-VP5, la proteína GST está fusionada a los aminoácidos 248 a 776 de la proteína VP4 de RRV.

Estas tres proteínas se purificaron por afinidad, utilizando agarosa-glutación que se une específicamente a GST y posteriormente se verificó su pureza por geles de SDS poliacrilamida y se cuantificó su concentración utilizando el método Bradford.

### **III.11 Purificación de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad.**

1.- Inocular Luria -ampicilina con 1/10 de volumen de un cultivo de 12 h fresco de bacterias que expresen la proteína de fusión que se quiere purificar, ya sea GST-VP8 o GST-VP5.

2.- Crecer durante 3 horas a 28-30 °C con agitación.

3.- Inducir con IPTG ( Isopropil  $\beta$ -D-tiogalactósido) 1M (1 $\mu$ L/mL de cultivo)

4.- Crecer 2 horas a 28-30 °C.

5.- Centrifugar las células 10 minutos a 7 500 g, en el rotor JA7.5 de la centrifuga Beckman J2-21.

6.- Resuspender el pellet en MCAC ( 5mL por cada 100 mL de cultivo original)

7.- Agregar 1 $\mu$ L/mL de PMSF (stock 20 mg/mL), justo antes de sonicar.

8.- Sonicar en lotes de 5 mL (3 veces 20 s con descansos de 20 s en hielo).

9.- Añadir 50  $\mu$ L/mL de Tritón X-100 (stock 20%).

10.- Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación ocasional.

11.- Centrifugar 15 min. a 15 000 g, en el rotor 16F6-38 en la centrífuga eppendorf 5403.

12.- Recuperar el sobrenadante y mezclar con Agarosa-Glutatión (susp. 50 %) previamente lavada con MCAC.

13.- Se utilizan 0.75 mL de resina (susp. 50 %) por cada 100 mL de cultivo original.

14.- Incubar 30 min. con agitación suave.

15.- Montar la resina en una columna.

16.- Lavar la resina con 10 volúmenes de MCAC

17.- Lavar la resina con 5 volúmenes de TN

18.- Eluir con 3 volúmenes de 10 mM glutatión reducido preparado en TN.

19.- Colectar fracciones de 1 mL

20.- Correr un gel de acrilamida-SDS con las fracciones eluidas.

### III.12 Geles de acrilamida-SDS.

Reactivos	11 %	4 %
Agua	2.6 mL	2.0 mL
Tris 2M pH 8.8	1.0 mL	108 $\mu$ L pH 6.8
Acrilamida-bisacrilamida 30:08 %	1.8 mL	330 $\mu$ L
SDS 10 %	50 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Persulfato de amonio 10 %	15 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Temed	3 $\mu$ L	1.2 $\mu$ L

1.- Se prepara el gel al 11 %, una vez que polimeriza, en la parte superior se adiciona un gel al 4 %, en donde se forman los carriles.

2.- Las muestras se mezclan con amortiguador de muestra y se hierven durante 3 minutos, después se colocan en los carriles del gel.

3.- Se agrega al gel amortiguador de corrida Tris-Glicina- SDS.(ver soluciones).

4.- Se realiza la corrida aplicando 12 mA hasta que el indicador alcance el final del gel.

5.- Una vez terminada la corrida se tiñe el gel con azul de Coomassie (ver soluciones)

### III. 13 SOLUCIONES

a) Azul de tripano.                      Azul de tripano                      0.2%  
Azida de sodio                              0.02 %  
PBS

b) Buffer TMSC	Tris pH 8	0.02 M	
	MgCl <sub>2</sub>	0.001 M	
	NaCl	0.15 M	
	CaCl <sub>2</sub>	0.01 M	
c)PBS	NaCl	8 g/l	
	KCl	0.2 g/l	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.15 g/l	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g/l	
	CaCl <sub>2</sub>	0.1 g/l	
	MgCl <sub>2</sub>	0.1g/l	
d) Buffer de Dietanolamina, pH 9	Dietanolamina	10 mL / l	
	MgCl <sub>2</sub>	0.2 g / l	
	Azida de sodio	0.29 g/ l	
e) Sustrato de peroxidasa para inmunotinción.	Soluciones	Carbazole	0.8g/ 200 mL dimetilformamida
		Acetatos pH 5	0.5M Acetato de sodio 0.5M Acido acético
Sustrato	Carbazole	3 mL	
	Acetatos	10 mL	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 µL	
f) Buffer MCAC	NaCl	0.5 M	



	Tris pH 8	20 mM
g) Buffer TN	NaCl	150 mM
	Tris pH 8	50 mM
h) Buffer de muestra (4X)	Tris pH 6.8	100 mM
	SDS	8 %
	Azul de azolfenol	0.4 %
	Glicerol	40 %
Antes de usar agregar	$\beta$ mercaptoetanol	10 $\mu$ L/0.25 mL debuffer de muestra.
i) Tris-Glicina	Tris base	2.42 g/l
	Glicina	11.4 g/l
	SDS 10 %	8 mL/l
j) Azul de Coomassie	Azul Coomassie	1.25 g
	Metanol	45 mL
	Acido acético	40 mL
	Agua	500 mL

### III.14 ANTICUERPOS

Las proteínas virales VP4 y VP7 inducen la producción de anticuerpos neutralizantes (8). Los anticuerpos neutralizantes son aquellos que al unirse al virus no permiten que éste lleve a cabo la infección.

Se han aislado una serie de anticuerpos monoclonales neutralizantes y no neutralizantes, cuya especificidad ha sido caracterizada.

Los anticuerpos monoclonales que se utilizaron, su especificidad y características, así como la región protéica a la cual éstos se unen (14) se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1. Características de los anticuerpos monoclonales utilizados.**

Anticuerpos utilizados	Proteína contra la que van dirigidos	Características	Aminoácido al que se unen
7A12	VP8	- Anticuerpo neutralizante - Inhibe la unión a la célula de RRV. - Inhibe la hemaglutinación	167
2G4	VP5	- Anticuerpo neutralizante - No inhibe la unión a la célula de RRV. - Inhibe la hemaglutinación	393
159	VP7	- Anticuerpo neutralizante. - No inhibe la unión de RRV	94
255	VP6	- Anticuerpo no neutralizante - No inhibe el pegado de RRV	172

## IV. RESULTADOS

### IV.1 Unión del virus a la célula.

Para estudiar las proteínas que participan en la unión de los rotavirus a su célula huésped se montó un ensayo de unión de virus a células en suspensión. En este ensayo el virus que se ha unido a las células es detectado por un ELISA utilizando un suero policlonal contra rotavirus como anticuerpo de captura.

Inicialmente, para determinar si la unión del virus a la célula depende de la cantidad de virus que se añade al ensayo, y si es que llega un punto en el que a pesar de añadir más virus ya no aumenta la unión del virus a la célula, es decir que el sistema es saturable. Se hizo el ensayo de unión del virus a la célula utilizando diferentes concentraciones del virus, partiendo de 40 ng/ $\mu$ L de virus y diluyendo hasta 1.25 ng/ $\mu$ L. La concentración del virus se determinó cuantificando la cantidad de proteína presente en la muestra por el método Bradford; se sabe que el 90 % del peso del virus esta formado por proteína y el 10 % restante es el material genético, de forma que es posible conocer la cantidad de virus presente en la muestra. En este ensayo utilizamos el virus silvestre RRV y la mutante neuraminidasa resistente, Nar, derivada de RRV. Al estandarizar la técnica se hicieron estudios para determinar cual era el tiempo óptimo de unión del virus a la célula y se resolvió hacer los ensayos con un periodo de incubación de una hora.

En la figura 3 se puede observar como la unión del virus a la célula es dependiente de la cantidad de virus que se agrega hasta llegar a una concentración de aproximadamente 10 ng/ $\mu$ L, después de la cuál ya no aumenta de manera lineal la cantidad de virus que se une a la célula.

### Unión de los virus a la célula

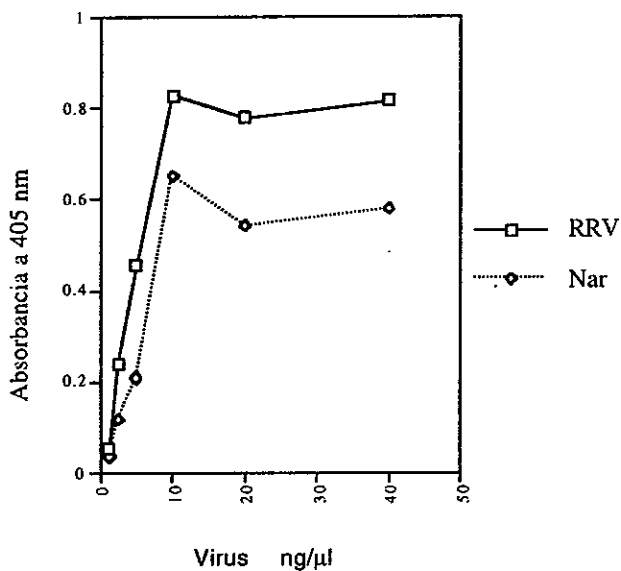


Fig. 3 Células MA104 ( $5 \times 10^4$ /ensayo) fueron incubadas con diferentes concentraciones de virus Nar o RRV, durante 1 hora a 4 °C. Siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos, al final las células se lisan con 0.1 % de Tritón X-100 y el virus unido es cuantificado por un ensayo de ELISA específico para rotavirus. En la gráfica se muestran los valores de absorbancia a 405 nm en función de la cantidad de virus utilizada en cada punto. Los ensayos se hicieron por duplicado.

Para estimar de manera cuantitativa la cantidad de virus que se une por célula realizamos el siguiente ensayo:

De manera simultánea al ensayo de unión del virus a la célula, se hizo un ELISA, utilizando las mismas concentraciones de virus, para determinar la relación entre absorbancia a 405 nm y concentración de virus. Tanto las muestras del ensayo de unión como muestras de distintas concentraciones de virus, fueron colocadas en la misma placa de ELISA y tratadas simultáneamente. De esta manera la absorbancia obtenida en un punto del ensayo de unión, puede ser referida a la absorbancia obtenida con una concentración conocida de virus (curva patrón) y así podemos saber que proporción del virus añadido al ensayo se unió a la célula.

Se hizo una regresión lineal de los datos de absorbancia a 405 nm del ELISA contra concentración de virus en la curva patrón, y se obtuvieron las ecuaciones de las rectas correspondientes al ELISA (curva patrón):

$$\text{Para RRV: } A_{405} = 0.079 (\text{Concentración}) + 0.084$$

En la figura 4 se observa que a una concentración de 5 ng/μL existe un cambio de pendiente en la curva, por lo que consideramos ese punto como la concentración a la cual se satura el receptor en la célula. En la curva de unión de RRV a la célula tenemos que a 5 ng/μL de virus se obtiene una absorbancia de 0.453. Sustituyendo este valor en la ecuación anterior tenemos que la concentración real de virus unido a la célula es 4.44ng/μL.

El volumen de la muestra en el pozo de ELISA es de 50 μL. Por lo tanto:

$$(4.44 \text{ ng}/\mu\text{L}) (50 \mu\text{L}) = 222 \text{ ng}$$

El peso molecular de rotavirus es de  $1 \times 10^8$  g/mol, y utilizando el número de Avogadro, tenemos que:

$$1 \times 10^8 \text{ g} = 6.02 \times 10^{23} \text{ partículas virales}$$

$$\text{por lo tanto } 222 \text{ ng} = 1.33 \times 10^9 \text{ partículas virales}$$

Como en el ensayo se utilizaron 50 000 células, dividimos el número de partículas virales obtenido entre el número de células, obteniendo:

$$1.33 \times 10^9 / 50000 = 26\,728 \text{ partículas virales de RRV se unen a cada célula}$$

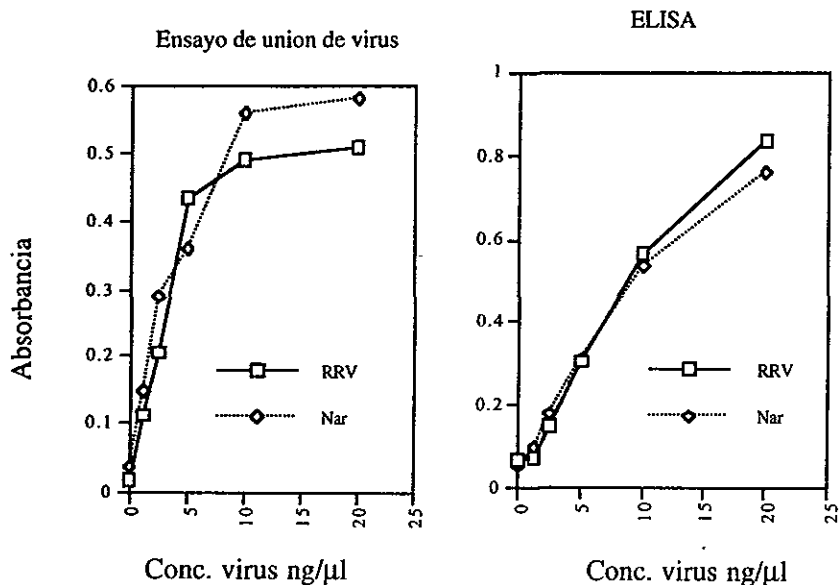


Fig.4 Las células MA104 fueron incubadas con diferentes concentraciones de virus. De manera simultánea al ensayo de unión del virus a la célula, se hizo un ELISA, utilizando las mismas concentraciones de virus, para determinar la relación entre absorbancia a 405 nm y concentración de virus. Tanto las muestras del ensayo de unión como muestras de distintas concentraciones de virus, fueron colocadas en la misma placa de ELISA y tratadas simultáneamente. De esta manera la absorbancia obtenida en un punto del ensayo de unión, puede ser referida a la absorbancia obtenida con una concentración conocida de virus (curva patrón) y así podemos saber que proporción del virus añadido al ensayo se unió a la célula. En la gráfica se muestran los resultados del experimento de unión y del ELISA, contra la concentración de virus. (Notesé la diferencia en la escala en el eje de la absorbancia)

Se hizo el mismo análisis para el virus Nar, obteniendo que:

$$A_{405} = 0.070 (\text{Concentración}) + 0.102$$

Con lo cual calculamos que 41 200 partículas virales de Nar se unen a cada célula

#### **IV. 2 Especificidad de la unión**

En la figura 5 que se muestra a continuación se estudió la capacidad de los anticuerpos monoclonales (AcM) 7A12 (dirigido contra VP8) y 2G4 (dirigido contra VP5) para afectar la unión de los virus Nar y RRV a la célula. También se utilizó el anticuerpo 159 (dirigido contra VP7) que es neutralizante y el AcM 255, dirigido contra VP6, que no neutraliza al virus (Ver Tabla 1).

En estos ensayos, los virus son incubados inicialmente con los anticuerpos monoclonales y posteriormente, la mezcla virus-anticuerpo se añade a las células en suspensión para realizar el ensayo de unión, como se ha descrito anteriormente. La cantidad de virus que se une a la célula se determina por ELISA.

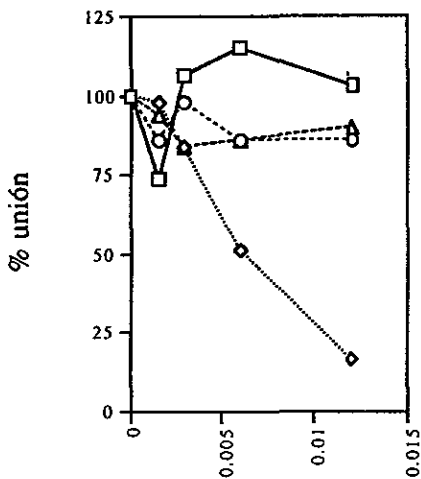
Este experimento nos permitiría además, determinar si la actividad neutralizante de un determinado anticuerpo es debida a que éste es capaz de prevenir el evento de unión del virus a la célula o a que bloquea algún paso posterior de la infección (por ejemplo la penetración).

En la figura 5a se puede observar que la unión del virus RRV sólo se ve afectada por el anticuerpo 7A12 dirigido contra VP8; en contraste la unión del virus Nar sólo se ve afectada por el anticuerpo monoclonal 2G4 dirigido contra la proteína VP5 (fig 5)

Estos resultados son consistentes con el hecho de que los rotavirus de origen animal se unen a la célula utilizando la región VP8 de la proteína VP4. La unión del virus Nar no es afectada por el anticuerpo 7A12, confirmándose que la unión de Nar a la célula es independiente de la interacción con ácido siálico. El hecho de que la unión de Nar se vea afectada al preincubar el virus con el anticuerpo

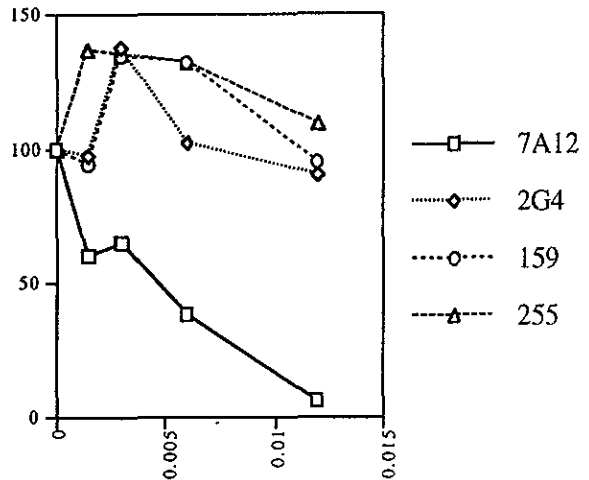
A)

Ensayo de unión de Nar en presencia de anticuerpos.



B)

Ensayo de unión de RRV en presencia de anticuerpos



#### Diluciones Anticuerpos

Figs. 5. Los virus Nar (a) y RRV (b) (18 ng/ $\mu$ L), se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, con distintas diluciones de los anticuerpos monoclonales, desde 1:80 hasta 1:640, la mezcla virus-anticuerpo se añadió a las células en suspensión para realizar el ensayo de unión, como se ha descrito anteriormente. La cantidad de virus que se une a la célula se determina por ELISA. En la figura se muestra el porcentaje de unión del virus, referido a la cantidad de virus unido a la célula en ausencia de anticuerpo, en función de la dilución de anticuerpo utilizada. Se muestra la unión del virus Nar y RRV en presencia de los anticuerpos 7A12 (VP8), 2G4 (VP5), 159 (VP7) y 255 (VP6). En ambas gráficas se muestra el promedio de 2 experimentos independientes.



dirigido contra VP5 (2G4), sugiere que el virus Nar se une a su célula huésped a través de VP5, sin utilizar ácido siálico.

El AcM 159, dirigido contra VP7 no afecta la unión de ninguno de los dos virus, lo que revela que la neutralización por este AcM ocurre en un paso posterior a la unión del virus, probablemente durante la penetración del virus a la célula.

### **IV.3 Unión de proteínas virales recombinantes a la célula.**

Para corroborar los resultados obtenidos, decidimos estudiar si las proteínas recombinantes VP8 y VP5 podrían competir de manera diferencial la unión de los virus RRV y Nar, de manera similar a lo observado con los AcM dirigidos contra estas proteínas.

En la fig. 6 se muestra un gel de acrilamida-SDS con las tres proteínas purificadas que se utilizaron en los siguientes experimentos.

En la figura 7 se puede ver el resultado de este experimento; encontramos que las proteínas se unen a la célula de manera específica, y además la proteína GST no se une por si misma a la célula, lo que sugiere que la parte responsable de la unión de las proteínas de fusión es el dominio de la proteína viral (VP5 o VP8) y no el dominio de GST.

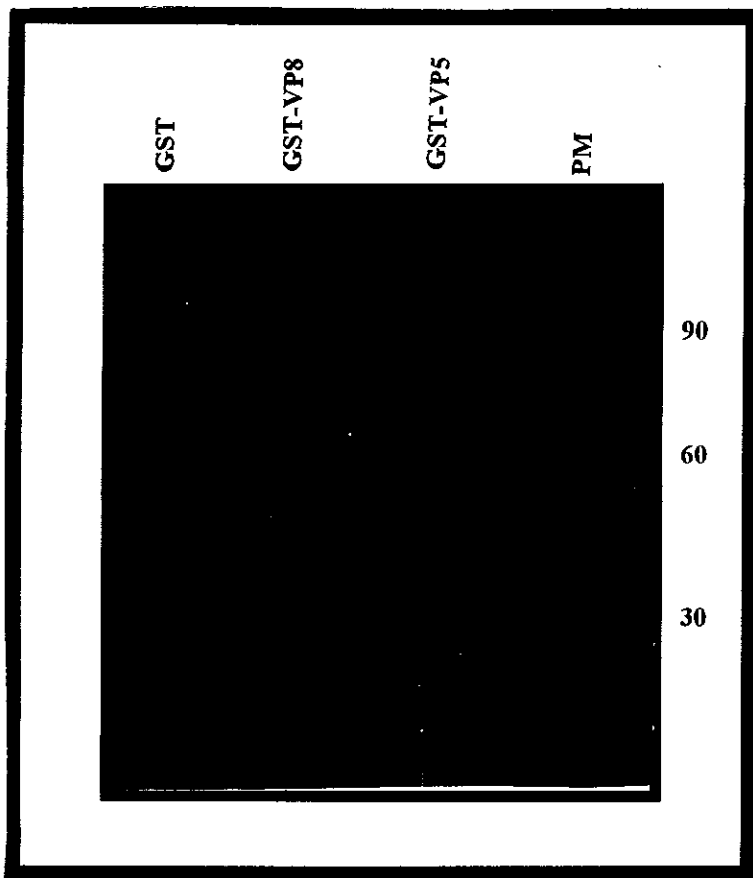


Fig 6. Gel de acrilamida-SDS al 11 %, teñido con Coomassie en donde se muestran las proteínas recombinantes obtenidas del lisado de bacterias y purificadas por cromatografía de afinidad que se utilizaron en los ensayos de competencia de unión.

### Unión de las proteínas a la célula

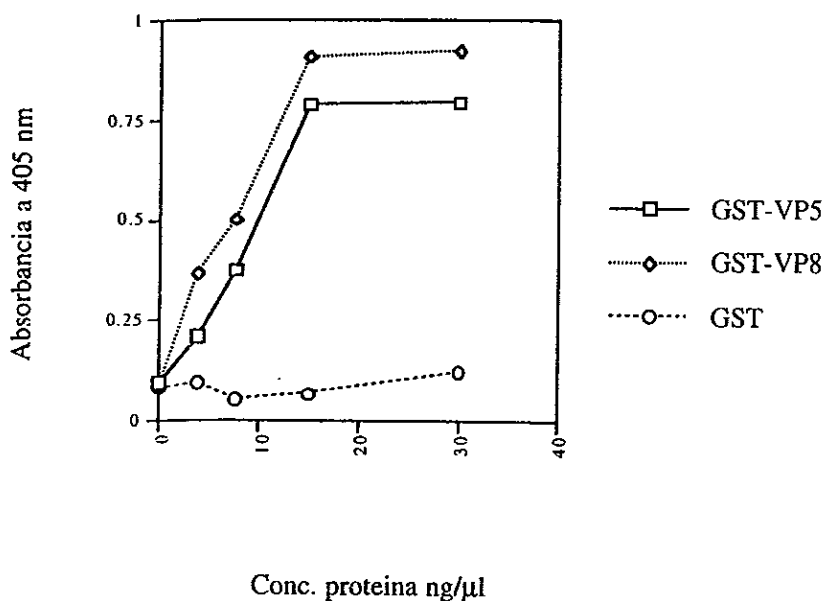


Fig. 7 Las células MA104 en suspensión se incubaron con diferentes concentraciones de proteínas GST-VP8, GST-VP5 y GST. Inicialmente se determinó si estas proteínas eran capaces de unirse a la célula, para lo que se realizó un ensayo de unión utilizando diferentes concentraciones de las proteínas purificadas. En estos ensayos el ELISA de detección se modificó, en este caso se utilizaron dos anticuerpos  $\alpha$ GST, uno obtenido en cabra como anticuerpo de captura y otro obtenido en conejo como anticuerpo detector. En la gráfica se muestran los valores de absorbanza para cada concentración de proteínas utilizada.

Para tratar de cuantificar la cantidad de proteína que en realidad se está uniendo a las células se hizo un ensayo similar al de cuantificación de los virus. Haciendo un ELISA simultáneo al ensayo de unión, (fig 8) y obteniendo las ecuaciones de las rectas que relacionan la absorbancia con la concentración de las proteínas en el ensayo de ELISA.

$$\text{Para GST-VP8 } A_{405} = 0.078 (\text{Concentración}) + 0.110$$

De la figura 8 se puede determinar que el punto en el que ocurre un cambio de pendiente es a 10 ng/μL, obteniéndose una absorbancia de 0.659. Sustituyendo en la ecuación anterior tenemos que equivalen a 7.038 ng/μL,; por lo tanto los ng totales que se unen a la célula son:

$$(7.038 \text{ ng}/\mu\text{L}) (50 \mu\text{L}) = 351.9 \text{ ng}$$

El peso molecular de la proteína GST-VP8 es 56 267 g/mol, entonces tenemos que:

$$56\,267 \text{ g} = 6.02 \times 10^2 \text{ moléculas}$$

$$351.9 \text{ ng} = 3.76 \times 10^{12} \text{ moléculas}$$

Si dividimos este número entre 50 000 células:

$$3.76 \times 10^{12} / 50000 = 7.52 \times 10^7 \text{ moléculas por célula}$$

Los cálculos para GST-VP5 dan la fórmula:  $A_{405} = 0.079 (\text{Concentración}) + 0.101$  y el resultado final es de:

$$2.96 \times 10^{12} / 50000 = 5.93 \times 10^7 \text{ moléculas por célula}$$

Encontramos que el número de moléculas de VP5 o de VP8 necesarias para ocupar todos los sitios en la célula es muy diferente (del orden de 2200 veces más proteína que virus) del que se obtuvo en la cuantificación del número de sitios para el virus. Esto puede ser debido a que las proteínas recombinantes empleadas en estos ensayos pueden encontrarse en forma de multímeros, por lo que pensamos que es necesario determinar el estado de agregación de estas proteínas para poder explicar el exceso de moléculas, ya sea de VP8 o de VP5 que se unen a la célula.

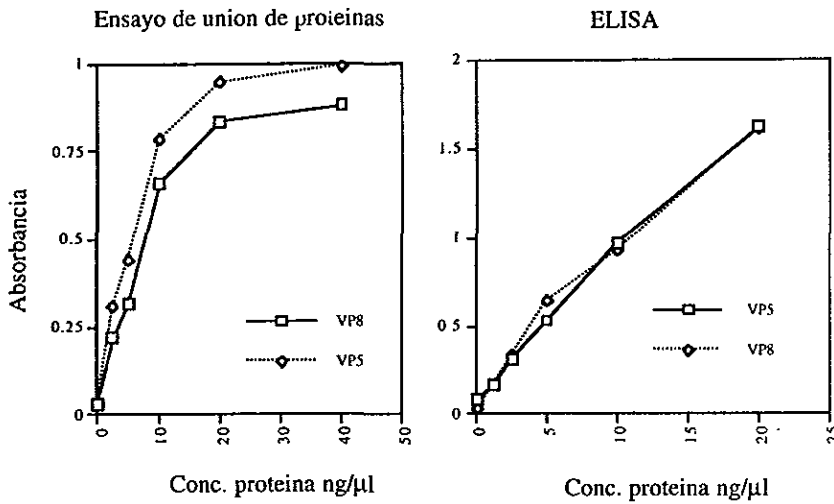


Fig. 8 Las células MA104 fueron incubadas con diferentes concentraciones de proteínas como en el experimento anterior. Para la cuantificación se llevó a cabo un ensayo de ELISA, de forma simultánea, de manera de correlacionar los datos de absorbancia con los de concentración. En la gráfica se muestran tanto el ensayo de unión como el ELISA, graficando las absorbancias obtenidas contra la concentración de proteína.

#### IV.4 Competencia de las proteínas virales por los sitios de unión.

Si las proteínas de fusión GST-VP8 y GST-VP5 están ocupando los mismos sitios a través de los cuales el virus se une a la célula, las proteínas deben de competir con la unión del virus. Para corroborar esa posibilidad competencia, las células fueron preincubadas con distintas concentraciones de las proteínas de fusión o de la proteína GST no fusionada (como control), y posterior a la incubación, se agregó una cantidad fija de virus y se llevó a cabo el protocolo de unión como se describió anteriormente.

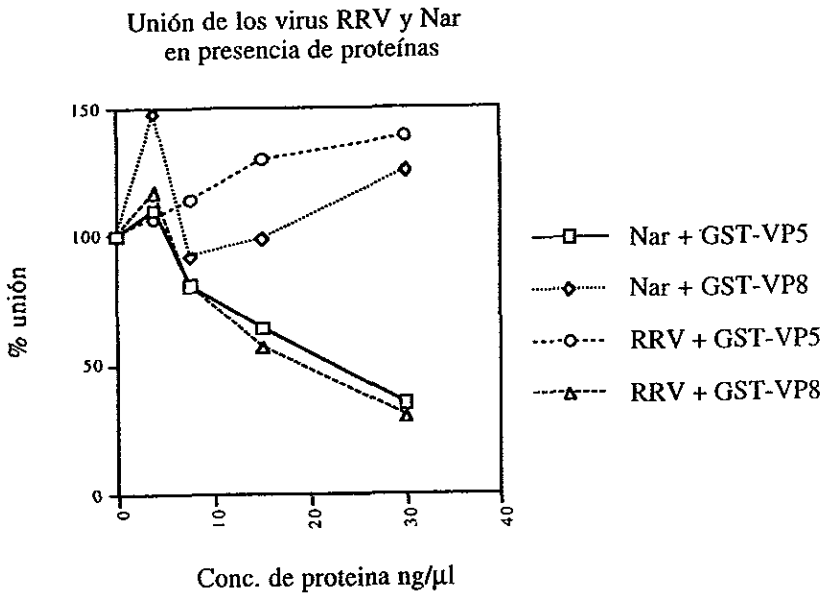


Fig. 9 Células MA104 se incubaron 1 hora a 4 °C con diferentes concentraciones de proteínas. Después de lavar las células, se incubaron con una concentración fija de virus (18 ng/μL), incubando una hora a 4 °C, y siguiendo el protocolo de unión como se ha descrito anteriormente. En estos ensayos, el ELISA se modificó, cambiando el anticuerpos de captura, para poder detectar de manera diferencial la unión del virus o de las proteínas. El anticuerpo policlonal anti YM que se utiliza normalmente en el ELISA es capaz de detectar tanto al virus como a las proteínas de fusión GST-VP8 y GST-VP5. En estos ELISAs se utilizó el AcM 159 que esta dirigido contra VP7 como anticuerpo de captura, ya que es capaz de detectar específicamente al virus, pero no reconoce a las proteínas de fusión. En la gráfica se muestra el porcentaje de unión del virus, expresado como la absorbancia obtenida, referida a la condición en la cual las células no se preincubaban con proteína, contra la concentración en cada punto.

En la figura 9 se puede observar que las proteínas compiten específicamente la unión de virus, y además esta competencia es selectiva, pues la proteína GST-VP8 es capaz de inhibir la unión de RRV, pero no la unión del virus Nar, en cambio la proteína GST-VP5 es capaz de competir la unión del virus Nar, pero no así la de RRV. La proteína GST, utilizada como control, no afecta la unión de ninguno de los virus.

Esos resultados correlacionan con los obtenidos en el ensayo de inhibición de la unión por los anticuerpos y sugieren que el virus RRV se une inicialmente a la célula a través de VP8 y el virus mutante Nar no utiliza este dominio de la proteína VP4, para unirse inicialmente a la célula, sino que lo hace a través de VP5.

#### **IV.5 Efecto en la infectividad de la competencia en los sitios de unión.**

Dado que las proteínas de fusión son capaces de inhibir de manera selectiva la unión a la célula de los virus RRV y Nar y dado que la unión es el paso inicial de la infección, decidimos estudiar si esta inhibición se veía reflejada en la infección viral. Para esto realizamos un ensayo de infectividad en el cuál las células en monocapa, sembradas en cajas de 96 pozos.

En la figura 10 se muestran los resultados de este experimento. Se puede observar que la preincubación de las células con la proteína GST-VP8 resultó en la inhibición de un 70 % de la infectividad de RRV, sin embargo esta proteína no afectó la infectividad del virus mutante Nar. Cuando se probó el efecto de la preincubación con la proteína GST-VP5 sobre la infectividad de estos mismos virus, encontramos que ésta fue capaz de inhibir en un 60 % la infectividad del virus Nar y en un 30 % la infectividad del virus RRV. La preincubación de las células con la proteína recombinante GST, en concentraciones iguales a las proteínas de fusión, no afectó la infectividad de ninguno de los dos virus.

Inhibición de la infectividad  
en presencia de las proteínas de fusión

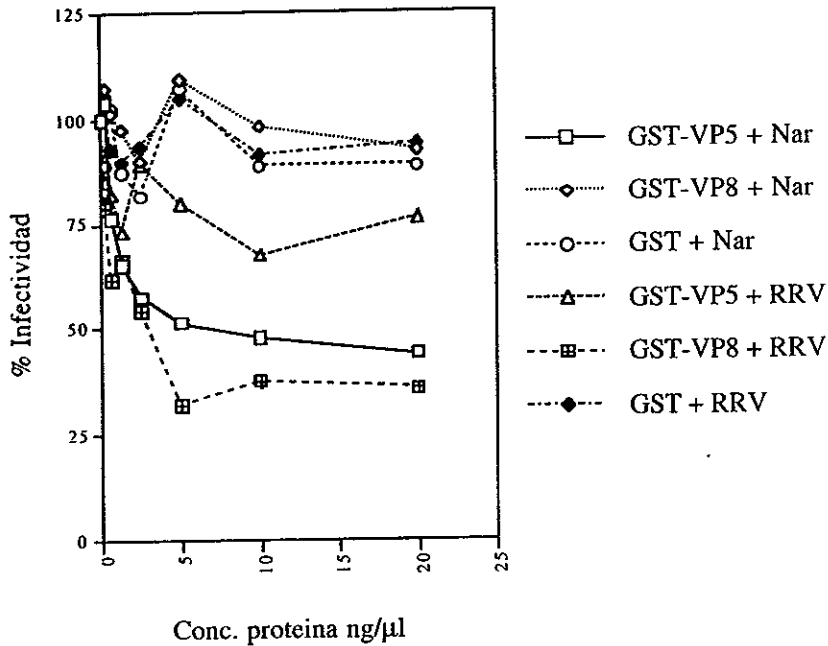


Fig 10 Monocapas de células MA104 en cajas de 96 pozos fueron preincubadas durante 30 minutos a 4 °C con distintas concentraciones de las proteínas GST-VP8, GST-VP5 y GST, desde 20 ng/μL, hasta 0.2 ng/μL. Posteriormente se añadieron 300 ffu's/pozo de los virus Nar y RRV. Los virus se adsorbieron durante 30 minutos a 4 °C y posteriormente se retiró el inóculo y se añadió MEM sin suero. La infección se prosiguió durante 12 horas a 37 °C, posteriormente las células fueron fijadas e inmunoteñidas como se indica en materiales y métodos. La gráfica muestra el porcentaje de infectividad, expresado como número de focos por pozo, referidos a la condición sin proteína (100 %), contra la concentración de proteína utilizada. La figura representa el promedio de dos experimentos independientes.



## V. DISCUSION Y CONCLUSIONES

En este trabajo estudiamos algunas características en los virus RRV y Nar que les permiten unirse a la célula de los virus RRV y Nar. El rotavirus RRV, es un virus de simio, que depende de la presencia de ácido siálico en la membrana de la célula para poder infectarla, y se sabe que la interacción de este virus con ácido siálico es a través del dominio de la proteína VP8 viral. El virus Nar es una mutante aislado a partir de RRV, que no depende del ácido siálico para la infección. Este mutante, que fue aislado en nuestro laboratorio, tiene tres cambios en la proteína VP4 (en el amino ácido 37 se cambio la leucina por una prolina, en el amino ácido 187 se cambió una lisina por una arginina, y en el amino ácido 267 el cambio fue una tirosina por una cisteína), con respecto al virus parental (RRV) y a través de su caracterización fue posible encontrar que la interacción del virus con el *ácido siálico presente en una proteína de la superficie de la célula, no es un paso esencial durante la infección por el rotavirus*. El hecho de que este mutante fuera capaz de producir hemaglutinación y es reconocido por anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos contra VP8 (pero no neutralizado), sugirió la existencia de al menos dos regiones en la proteína VP4 capaces de interactuar con la célula (12).

En este trabajo encontramos que ambos virus se unen a la célula de manera dependiente de la concentración (figs 3 y 4), sin embargo su unión puede ser bloqueada de manera diferencial. La unión del virus RRV puede ser bloqueada por anticuerpos dirigidos contra VP8, pero no con anticuerpos dirigidos contra VP5, en cambio la unión de Nar es bloqueada por el anticuerpo dirigido contra VP5, pero no con el que esta dirigido contra VP8. Cuando ensayamos la capacidad de las proteínas recombinantes GST-VP8 y GST-VP5 de unirse a la célula, encontramos que ambas fueron capaces de unirse de manera dependiente de la concentración, y además fueron capaces de evitar por competencia, la unión de los virus de manera igualmente selectiva; GST-VP8 fue capaz de competir la unión de RRV, pero no la de Nar y GST-VP5 aunque no compitió la unión de RRV si fue capaz de competir de manera eficiente la unión del virus Nar. En conjunto estos resultados nos permiten sugerir

que mientras el rotavirus de simio RRV (que depende de ácido siálico) se une inicialmente a la célula a través de VP8, el mutante Nar lo hace a través de VP5.

El encontrar que la proteína VP5 se une de manera específica a la célula y que es capaz de competir con la unión del rotavirus Nar representa un hallazgo nuevo, dado que hasta ahora no se había demostrado de una manera directa, alguna función para este dominio de la proteína VP4.

Cuando estudiamos el efecto de las proteínas recombinantes sobre la infectividad de los virus RRV y Nar encontramos que, mientras la proteína GST-VP8 sólo fue capaz de inhibir la infectividad del virus RRV, la proteína GST-VP5 fue capaz de inhibir la infectividad de ambos virus. Este resultado lo podemos explicar si suponemos que la unión del virus a la célula consta de al menos 2 pasos: en el primero el virus interactúa con los ácido siálico de una proteína de la membrana celular a través de VP8 y posteriormente interactúa a través de VP5 con otra molécula en la superficie celular. Esta suposición se apoya en el hecho de que la proteína VP5 tiene un efecto en la inhibición de la infectividad de RRV, sugiriendo que el sitio de unión a la célula que usa VP5 es necesario para la infectividad de RRV. Es posible que este efecto sea pequeño debido a que una vez unido el virus a la célula, éste sea capaz de desplazar a la proteína durante su internación .

En conclusión encontramos que los virus RRV y el mutante independiente de ácido siálico derivado de este, Nar, se unen a la célula utilizando dos lugares diferentes en la superficie de ésta. El virus Nar, no es afectado por la ausencia de ácidos siálicos en las moléculas de la superficie de la célula. Incluso parece no utilizarlas para unirse a la membrana, ya que la unión de Nar no se ve afectada por los anticuerpos monoclonales dirigidos contra VP8. Además, los anticuerpos contra VP5 inhiben su unión a la célula lo que evidencia que es incapaz de usar el sitio dependiente de siálico para llevar a cabo la unión inicial, o bien que lo utiliza muy poco y que es una interacción poco favorecida.

Suponemos entonces que el mecanismo de unión de los rotavirus a su célula huésped consta al menos de dos pasos. El primero sería la unión del virus a través de ácido siálico, lo cuál podría originar un cambio conformacional de VP4 que permitiría la interacción de la región VP5 con un receptor más específico independiente de ácido siálico, esta segunda interacción podría ser directamente responsable de la penetración del virus, aunque cabe la posibilidad de que pudiese existir una tercera molécula responsable de la entrada.

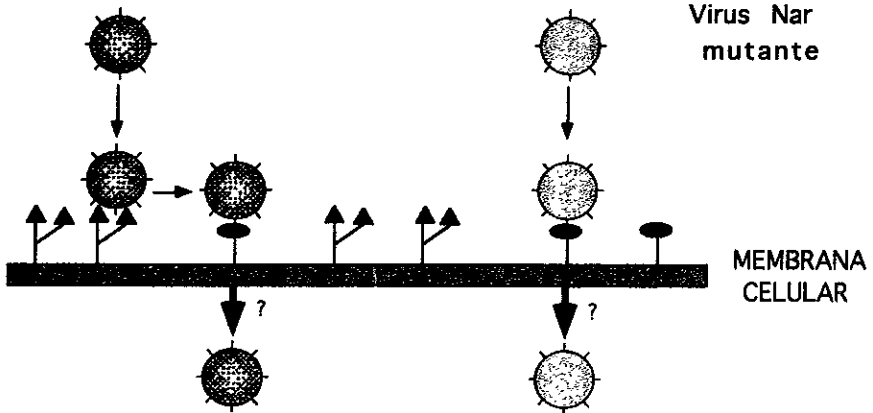
Es posible que el virus mutante Nar posea ya el cambio conformacional que permita la exposición de VP5 y por ello no requiera de ácido siálico para unirse a la célula, pues se uniría directamente con el segundo receptor; mientras que los rotavirus animales silvestres tendrían que pasar por ambos receptores para poder infectar a la célula.

En la figura 11 se muestra un modelo que representa las interacciones que suponemos se llevan a cabo durante las primeras interacciones del virus con su célula huésped.

**MODELO DE LAS PRIMERAS INTERACCIONES  
ROTAVIRUS - CELULA**

Virus silvestre  
RRV

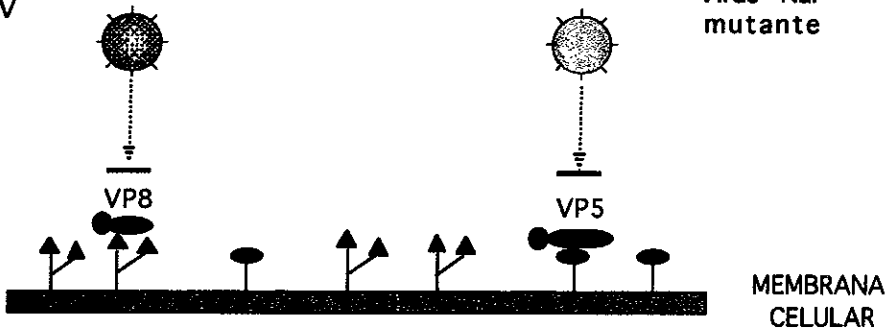
Virus Nar  
mutante



CELULAS PREINCUBADAS CON PROTEINAS RECOMBINANTES

Virus silvestre  
RRV

Virus Nar  
mutante



- receptor que contiene ácido siálico
- receptor independiente de ácido siálico
- GST

Fig 11

## VI. PERSPECTIVAS

El estudio de la unión de los rotavirus a la superficie de su célula huésped nos permite un acercamiento al mecanismo que utiliza para internalizarse a la célula y nos proporciona información acerca los receptores requeridos en la célula.

Si bien en este trabajo se han caracterizado algunos aspectos importantes en la unión quedan por probar otros. Una de las estrategias que se pueden utilizar es el empleo de proteínas de fusión que tengan diferentes mutaciones, y evaluar si se unen, o bien si compiten la unión del virus con la célula. Actualmente se cuenta con mutantes de la proteína recombinante GST-VP8 que han perdido la actividad de hemaglutinación y con una proteína recombinante GST-VP5 que esta mutada en la posible región de fusión. Si en efecto el sitio de unión a la célula que se encuentra en VP8 es el mismo que el dominio de hemaglutinación, se esperaría observar una disminución en la unión de una proteína mutante que ha perdido la capacidad de hemaglutinar. Por otro lado queda por mapear la región de VP5 responsable de la interacción con la célula, por ejemplo se podría dilucidar si el probable péptido de fusión en la proteína VP5 es una región importante en la unión de esta proteína a la membrana de la célula, aunque es posible que el sitio de unión se encuentre en otra región de VP5.

Recientemente se ha reportado la existencia de tres regiones en el virus que corresponden a péptidos que reconocen integrinas una de las cuales esta localizada en VP5 entre los aminoácidos 307-309 (2). Las integrinas son proteínas celulares, transmembranales, que pueden actuar como receptores en la superficie de la célula. En el mismo trabajo se reportó que el receptor para rotavirus podría ser una integrina. Por lo cual se podría probar si anticuerpos dirigidos contra integrinas impiden la unión del virus a la célula.

Tampoco se ha dilucidado el papel que pueda tener la proteína VP7 en la unión del virus o en la penetración, aún cuando el anticuerpo 159 dirigido contra VP7 que se probó en este trabajo, no

inhibió la unión de ninguno de los dos virus, podrían probarse otras maneras de estudiar si esta proteína tiene alguna función en este evento.

Las cepas de rotavirus que infectan a humanos no requieren la presencia de ácidos siálicos en la membrana celular, pero no es claro que utilicen la misma molécula que Nar para unirse a la célula, por lo cual sería interesante incluir en el estudio de unión un virus de esta tipo.

También se pueden utilizar anticuerpos dirigidos contra la célula que inhiban la unión de los virus o de algún tipo de ellos, de manera que se puedan correlacionar los datos y tener un modelo completo de la unión de diferentes cepas a la célula, lo que además nos permitiría identificar las moléculas celulares con las cuales el virus interacciona.

Por otra parte se sabe que los rotavirus son capaces de unirse a una gran variedad de líneas celulares, aunque solo son capaces de infectar a un pequeño subgrupo de estas, por lo que otro aspecto que podría estudiarse es la unión de diferentes cepas de rotavirus en líneas celulares no permisivas a la infección. La caracterización de este tipo de uniones nos podrían indicar cuál es el receptor específico que permite la entrada del virus y que hace que una línea celular sea o no susceptible de ser infectada.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. **Arias, C. F., P. Romero, V. Alvarez, and S. Lopez.** 1996. Trypsin Activation Pathway of Rotavirus Infectivity. *J Virol.* **70**:5832 - 39.
2. **Coulson, B., S. Londrigan, and D. Lee.** 1997. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc natl Acad Sci USA.* **94**:5389 - 5394.
3. **Estes, M. K.** 1996. Rotaviruses and their replication. *In* B. N. Fields and D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, vol. 2. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa. p. 1625- 1655
4. **Estes, M. K., D. Y. Graham, and B. B. Mason.** 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J Virol.* **39**:879-88.
5. **Fuentes Panana, E. M., S. Lopez, M. Gorziglia, and C. F. Arias.** 1995. Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses. *J Virol.* **69**:2629-32.
6. **Isa, P., S. Lopez, L. Segovia, and C. F. Arias.** 1997. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J Virol.* **71**:6749 - 56.
7. **Kaljot, K. T., R. D. Shaw, D. H. Rubin, and H. B. Greenberg.** 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol.* **62**:1136-44.

8. **Kapikian, K. T., and R. M. Chanock.** 1996. Rotaviruses. *In* B. N. Fields and D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, vol. 2. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa. p. 1657 - 1708
9. **Keljo, D. J., and A. K. Smith.** 1988. Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **7**:249-56.
10. **Lizano, M., S. Lopez, and C. F. Arias.** 1991. The amino-terminal half of rotavirus SA114fM VP4 protein contains a hemagglutination domain and primes for neutralizing antibodies to the virus. *J Virol.* **65**:1383-91.
11. **Mackow, E. R., R. D. Shaw, S. M. Matsui, P. T. Vo, M. N. Dang, and H. B. Greenberg.** 1988. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**:645-9.
12. **Mendez, E., C. F. Arias, and S. Lopez.** 1993. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J Virol.* **67**:5253-9.
13. **Mendez, E., C. F. Arias, and S. Lopez.** 1992. Genomic rearrangements in human rotavirus strain Wa; analysis of rearranged RNA segment 7. *Arch Virol.* **125**:331-8.
14. **Ruggeri, F. M., and H. B. Greenberg.** 1991. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J Virol.* **65**:2211-9.



15. **Yeager, M., J. Berriman, T. Baker, and A. Bellamy.** 1994. Three dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. *EMBO Journal*. **13**:1011-1018.