



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

“Estudio del mecanismo de formación de los viroplasmias de rotavirus”.

TESIS

Presentada como requisito parcial para
obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Biomédicas

Presenta:

Claudio Cabral Romero

Director de Tesis: Dr. Luis Padilla Noriega

México D. F., Octubre del 2006



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, en especial a mis padres por darme educación, es lo mejor que me pudieron haber dado y se los agradeceré toda la vida.

Agradezco a todos los miembros del laboratorio del Dr. Luis Padilla Noriega del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México donde se realizó este trabajo.

Agradezco a todos mis amigos como Sergio Solórzano, Simón Guzmán León, y a todas aquellas personas que han hecho posible que hoy pueda estar aquí y que en estos momentos no recuerdo su nombre.

Agradezco a mi comité tutorial: al Dr. Luis Padilla Noriega, Dr, Luis Vaca Domínguez y al Dr. Félix Recillas Targa quienes me han asesorado en esta etapa importante de mi vida profesional.

Agradezco la asesoría técnica de M.C. Simón Guzmán León y de M. C. Carolina Piña Vázquez.

Agradezco la asesoría técnica del MVZ Gerardo Arrellín Rosas y de la MVZ Georgina Ema Santillan Rivero.

AGRADECIMIENTOS

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

33371-N del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT),
México.

IN222402 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación Científica
y Tecnológica (PAPIIT) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

IN210906 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación Científica
y Tecnológica (PAPIIT) de la Universidad Nacional Autónoma de México

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por todo su apoyo, cariño, comprensión y sobre todo por estar a mi lado cuando los necesitaba, espero algún día poder pagarles todo lo que me han dado.

INDÍCE DE FIGURAS

Índice de mortalidad por enfermedad diarreica por rotavirus.....	3
Partículas de rotavirus observadas por microscopía electrónica.....	13
Estructura del rotavirus.....	16
Estructura de los RNAm de rotavirus.....	19
Patrón electrofóretico de los RNAd de rotavirus.....	21
Ciclo de replicación de rotavirus.....	33
Partículas semejantes a rotavirus.....	42
Viroplasmias de rotavirus.....	46
Identificación del rotavirus SA11.....	78
Obtención del RNAd del rotavirus SA11.....	79
Amplificación del segmento 8 del rotavirus SA11.....	80
Propagación del plásmido recombinante pET28b-SA11-8.....	81
Transformación de BL21-DE3 con pET28b-SA11-8.....	83
Determinación de la expresión de NSP2 recombinante.....	85
Determinación de la expresión de NSP2 recombinante a diferentes tiempos de inducción.....	86
Purificación de NSP2 por columna de Ni-NTA de pastillas de <i>E. coli</i>	88
Evaluación del suero anti-NSP2 en células infectadas por rotavirus.....	90
Co-localización intracelular de los viroplasmias y microtubulos.....	92
Efecto del nocodazol sobre la formación de los viroplasmias.....	94
Co-inmunoprecipitación de NSP2 con tubulina a partir de Células infectadas por rotavirus.....	96
Expresión de NSP2, NSP5 y VP2 en células de riñón de mono por el sistema híbrido del virus vacinia-T7.....	98
Distribución intracelular de NSP2, NSP5 y VP2 en células Infectadas por rotavirus.....	100
Co-inmunoprecipitación de NSP2 ó NSP5 con tubulina a partir de células que expresan ambas proteínas virales.....	102
Co-inmunoprecipitación en forma individual de NSP2 ó NSP5 con tubulina.....	104
Asociación de NSP2 o NSP5 con microtúbulos en células Infectadas por rotavirus a diferentes tiempos post-infección.....	106

Viroplasmos a diferentes tiempos post-infección visualizando a NSP2 ó NSP5.....	107
Distribución intracelular de NSP2 ó VP2 expresadas en forma Individual ó co-expresadas por el sistema del virus vaccinia-T7.....	109
Co-inmunoprecipitación de NSP2 con anticuerpos anti-VP2.....	111

ÍNDICE

Agradecimientos.....	I
Dedicatoria.....	III
Resumen.....	IV
Introducción.....	1
Capítulo I. Epidemiología de rotavirus.....	1
I.I Morbilidad y mortalidad asociada a rotavirus a nivel mundial.....	1
I.II Impacto de la enfermedad por rotavirus en México.....	4
Capítulo II. Descripción de los rotavirus.....	6
II.I Clasificación de los rotavirus.....	6
II.II Estructura de rotavirus.....	12
II.III Genoma de rotavirus.....	15
II.IV Proteínas de rotavirus.....	23
II.IV.I Proteínas estructurales.....	23
II.IV.II Proteínas no-estructurales.....	26
Capítulo III. Replicación de rotavirus.....	30
III.I Etapas del ciclo de replicación de rotavirus.....	31
III.I.I Adsorción, penetración y pérdida de la capa externa.....	31
III.I.II Transcripción, traducción, y replicación de rotavirus.....	36
III.I.III Encapsidación del RNAm y ensamble del virión.....	39
III.I.IV Liberación del virus maduro.....	43
Capítulo IV. Viroplasmias de rotavirus.....	44
Planteamiento del problema.....	48
Hipótesis.....	51
Objetivos.....	53
Metodología.....	55
Resultados.....	75
Discusión.....	112

Aportaciones al campo.....	117
Bibliografía.....	119
Apéndice.....	149
Apéndice A.....	150
Apéndice B.....	151
Apéndice C.....	152
Apéndice D.....	153
Apéndice E.....	154

RESUMEN

La replicación y ensamble de rotavirus tiene lugar en estructuras esféricas electrodenudas llamadas viroplasmos, cuyos componentes principales son las proteínas virales NSP2 y NSP5. Los viroplasmos son producidos en la etapa temprana de la infección y parecen crecer por la adición constante de proteínas virales y por fusión de viroplasmos preformados, aunque el mecanismo de su formación es aun desconocido. En este estudio encontramos que la superficie de los viroplasmos co-localiza con los microtúbulos y parecen estar “enjaulados” por una red de microtúbulos. Además la inhibición del ensamble de los microtúbulos con nocodazol interfirió con el crecimiento de los viroplasmos en células infectadas por rotavirus. Nosotros buscamos a continuación el puente físico entre los viroplasmos y los microtúbulos por ensayos de co-inmunoprecipitación, y encontramos que las proteínas NSP2 y NSP5 fueron co-inmunoprecipitadas con anti-tubulina en células infectadas por rotavirus y también cuando fueron transitoriamente co-expresadas ó expresadas individualmente. Adicionalmente se detectó una nueva interacción entre las proteínas virales NSP2 y VP2 por ensayos de inmunofluorescencia y co-inmunoprecipitación. Estos resultados indican que una red de microtúbulos funcional es necesaria para el crecimiento de los viroplasmos, presumiblemente debida a la asociación de viroplasmos con los microtúbulos vía NSP2 y NSP5. La nueva interacción encontrada entre NSP2 y VP2 sugiere que NSP2 podría jugar un papel fundamental al reclutar a las proteínas virales que conforman los viroplasmos una vez asociada a los microtúbulos.

INTRODUCCIÓN

Capítulo I Epidemiología de rotavirus.

I. I Morbilidad y mortalidad asociada a rotavirus a nivel mundial.

Los rotavirus constituyen el agente etiológico principal de enfermedad diarreica en infantes y niños menores de 2 años de edad en todo el mundo (Bishop, 1994). La infección por rotavirus ocurre con gran frecuencia en los países industrializados, pero la mortalidad es baja (figura 1), en los Estados Unidos los rotavirus causan entre el 5 y 10% de todos los episodios de diarrea en niños menores de 5 años; sin embargo, estos virus están presentes en 30–50% de los casos de diarrea severa (Centers for Disease Control, 1999). En este grupo de edad, se estima que los rotavirus son los responsables anualmente de aproximadamente 2.7 millones de episodios de enfermedad diarreica, 410 000 visitas al médico, 160 000 emergencias, 50 000 hospitalizaciones y 20 muertes. Y aunque no sea un problema grave de salud pública en este país, si representa un problema muy costoso, más de 264 millones de dólares en gastos médicos directos y más de un billón de dólares en costo total para la sociedad (Tucker *et al.*, 1998).

En países en desarrollo, los rotavirus constituyen el agente etiológico más importante de diarrea en infantes y niños jóvenes. En estos países se ha estimado un total de 1.4 billones de casos; más del 10 % de estos casos fueron considerados de moderadamente severos a severos requiriendo visita clínica (Parashar *et al.*, 2003). Además se ha estimado que 400, 000 y 600 000 infantes y niños menores de 5 años mueren por enfermedad diarreica por rotavirus cada año en el mundo (Parashar *et al.*, 2003). Por lo tanto, durante los primeros 5 años de vida cada niño experimentará un episodio de diarrea por rotavirus (tanto en países en desarrollo como industrializados), sin embargo las consecuencias serán muy diferentes en ambos países: 1 de 8 desarrollaran enfermedad moderadamente severa y 1 en 160 morirá respectivamente (Glass *et al.*, 1994).

Estudios prospectivos en áreas en desarrollo del mundo han demostrado la magnitud del problema de enfermedades diarreicas en general, y la mayoría de los estudios han puntualizado la capacidad de rotavirus de inducir enfermedad deshidratante. En un estudio de 30 meses en el noroeste de Brasil, la mortalidad de los niños excedía el 14% durante los primeros 4 años de vida. Además, en el 52% de las muertes, la diarrea estaba enlistada como la causa principal, o bien asociada a la causa de la muerte (Guerrant *et al.*, 1983).

La incidencia y patrones epidemiológicos de la infección por rotavirus varían entre las diferentes regiones geográficas (Bartlett *et al.*, 1988; Kapikian *et al.*, 1976; Houly *et al.*, 1984; Kono *et al.*, 1983; LeBaron *et al.* 1990; Matson *et al.*, 1990). En regiones templadas los picos de mayor actividad se presentan en los meses más fríos del año (otoño-invierno), y los casos esporádicos durante los meses de verano.

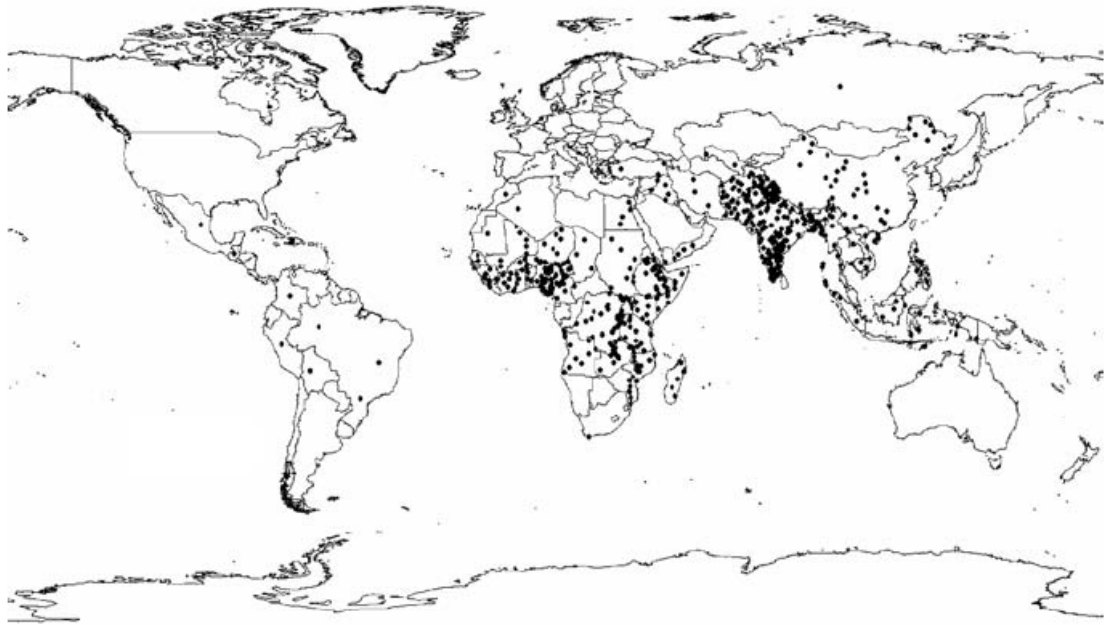


Figura 1. Distribución global estimada de las 600, 000 muertes anuales de niños con diarrea asociada a rotavirus. Cada punto indica 1000 muertes. Tomado de Parashar *et al.*, 2006.

I. II Morbilidad y mortalidad asociada a rotavirus en México.

En México las enfermedades diarreicas son un problema importante de salud pública. La diarrea es una de las cinco causas más comunes de morbilidad y mortalidad entre niños menores de cinco años de edad (Programa Nacional de Acción a favor de la Niñez. Evaluación 1990-2000). Datos de mortalidad entre 1989 y 1994 para enfermedades diarreicas en niños mexicanos de 5 años de edad han mostrado patrones temporales, con una disminución en la prevalencia de muertes por diarrea durante la temporada primavera-verano y un incremento en la frecuencia en el periodo otoño-invierno (Gutiérrez, 1996; Villa *et al.*, 1999). Se estima que en México anualmente la infección por rotavirus es causante de aproximadamente 1, 000 muertes (Braine, 2005).

Velázquez y colaboradores (Velázquez *et al.*, 2004) estudiaron la morbilidad y mortalidad de enfermedad diarreica por rotavirus en México en un periodo de 12 años (de 1990 al 2002). Estos datos mostraron un incremento inicial en la morbilidad correspondiente al periodo de 1995 a 1999, seguida de una disminución para el año 2002, sin ningún patrón temporal. Aunque de 1990 a 1995, la morbilidad para diarrea severa disminuyó en un 63%. De 1996 al 2002, del 62 al 68% de los episodios por diarrea severa ocurrieron durante la temporada otoño-invierno, comparado con un 6-12% en la temporada primavera-verano.

La mortalidad por diarrea por rotavirus correspondiente al periodo de 1990-2002, disminuyó en un 84%. De 125.3 muertes por 10, 000 niños menores de cinco años en 1990 a 64. 6 muertes en 1992 y solamente 9.6 en el 2002.

La alta tasa de mortalidad en niños menores de 1 año, coincidió con la temporada otoño-invierno. Tanto los episodios de diarrea severa como muertes por diarrea denotaron un cambio temporal.

A pesar de la importancia de las enfermedades diarreicas en México, específicamente el impacto de enfermedad diarreica por rotavirus en la provincia ha sido poco estudiado. La epidemiología de infecciones por rotavirus fue analizada en Yucatán, en el periodo de Enero a Mayo del 2000, encontrando que la incidencia fue similar a la reportada en otras regiones de clima similar, y que la población más susceptible eran los niños menores de un año (Rodríguez-Angulo *et al.*, 2002). Recientemente la epidemiología de infecciones por rotavirus fue estudiada en San Luis Potosí, durante un periodo de 6 años por Noyola y colaboradores (Noyola *et al.*, 2005), encontrando que el periodo epidémico de cada año de estudio comenzaba en el mes de Octubre ó Noviembre, que el pico de actividad máxima fue detectado entre Diciembre y Febrero y que el termino del periodo epidémico ocurría en Marzo ó Abril. Estos datos muestran un patrón temporal consistente en esa comunidad.

Capítulo II. Descripción de los rotavirus.

Los rotavirus fueron descubiertos en 1973 por Bishop y colaboradores (Bishop *et al.*, 1973) empleando microscopía electrónica como partículas de 70 nm de diámetro asociadas con diarrea endémica severa en infantes y niños jóvenes (2-6 años). El cultivo de rotavirus en líneas celulares continuas ha permitido estudiar las características tanto morfológicas como bioquímicas de los rotavirus.

El virión maduro posee un diámetro de 70 nm y una cápside icosaédrica compuesta por tres capas proteicas concéntricas que engloban a la RNA polimerasa viral y a la transcriptasa y metilasa viral, además del genoma viral. Rotavirus tiene como genoma 11 segmentos de RNAcd, monocistronicos, esto es que cada gen codifica por lo menos para una proteína viral. El virus es capaz de sufrir rearrreglos genéticos, su replicación ocurre en el citoplasma de las células infectadas. El cultivo *in vitro* de rotavirus requiere del tratamiento previo del virus con proteasas, lo cual aumenta la infectividad del virus debido al procesamiento de VP4, una de las proteínas de la capa proteica externa. El virus exhibe una vía de morfogénesis única. La partícula madura no es envuelta y los viriones son liberados de la célula infectada por lisis celular ó bien por transporte vesicular no clásico en células epiteliales polarizadas.

II. I Clasificación de los rotavirus.

Los rotavirus constituyen uno de los 8 géneros de virus con genoma de RNA de cadena doble (RNAcd) de la familia *Reoviridae*, y comparten características tanto morfológicas como bioquímicas (tabla 1).

Estructura

Partículas icosaédricas de 65-75 nm

Cápside proteica de triple capa

No posee envoltura (resistente a solventes lipídicos)

La cápside contiene las enzimas necesarias para producir el RNAm

Genoma

11 segmentos de RNA de cadena doble (RNAd)

Segmentos de RNA purificados no son infecciosos

Cada segmento codifica por lo menos a una proteína

Segmentos de RNA de diferentes virus rearreglan con alta frecuencia durante infecciones duales de células

Replicación

El cultivo favorecido por proteasas

Replicación citoplasmática

Formación de cuerpos de inclusión

Morfogénesis única involucrando envoltura transitoria

Liberación del virus por lisis celular ó por transporte vesicular no clásico en células epiteliales polarizadas

Tabla 1. Características generales de los rotavirus.

Los rotavirus son clasificados serológicamente por un esquema que permite la presencia de grupos múltiples (serogrupos) y por la existencia de varios serotipos dentro de cada grupo. Los rotavirus del grupo A incluyen virus que comparten reacción cruzada, antígenos detectables por un número de pruebas serológicas, tales como inmunofluorescencia, ELISA, y microscopía inmunoelectrónica.

Los rotavirus se clasifican en siete grupos distintos de la A ha la G. Los rotavirus de los grupos A, B y C son aquellos encontrados tanto en humanos como en animales, mientras que los virus de los grupos D, E, F, y G han sido

hasta la fecha encontrados solamente en animales. Los virus de cada grupo son capaces de presentar rearrreglos genéticos, pero entre virus de diferente grupo no aparecen rearrreglantes (Yolken *et al.*, 1988). El determinante antigénico de grupo, ó antígenos comunes, son encontrados en su mayoría en las proteínas estructurales y probablemente en muchas de las proteínas no estructurales también. Sin embargo, los epitopes sobre la capa proteica intermedia VP6, son aquellos usualmente detectados por ELISA.

Los rotavirus del grupo A han sido claramente establecidos como causantes significativos de enfermedad diarreica en los niños jóvenes. Los rotavirus del grupo B han sido asociados con epidemias anuales de diarrea severa, principalmente en adultos en China (Su *et al.*, 1983). Los rotavirus del grupo C han sido reportados esporádicamente en muestras de niños con diarrea y en varios brotes; el significado clínico permanece incierto. Muy pocas cepas de rotavirus no pertenecientes al grupo A (una porcina del grupo C, una humana del grupo C y una porcina del grupo B) han podido ser cultivadas (Saif *et al.*, 1988; Sanekata *et al.*, 1986; Shinozaki *et al.*, 1996; Welter *et al.*, 1991), por lo que la mayor parte de la información generada hasta el momento corresponde a los rotavirus del grupo A.

Dentro de cada grupo, los rotavirus son clasificados en serotipos definidos por reactividad de virus en reducción de placa (o reducción de foco fluorescente) ó ensayos de neutralización utilizando suero hiperínmune preparado en animales negativos a anticuerpos contra rotavirus. Empleando tales ensayos, 14 serotipos VP7 han sido identificados (ver tabla 2), y cepas de origen animal y humano caen dentro del mismo serotipo (tabla3).

Los ensayos de neutralización pueden medir reactividad de anticuerpo con los dos antígenos neutralizantes externos (VP4 y VP7). La clasificación de los rotavirus es por un sistema binario (similar al usado para influenza) en el cual distintos serotipos de VP4 y VP7 son reconocidos (Graham and Estes, 1985; Hoshino *et al.*, 1984; Rodger and Holmes, 1979). Sin embargo,

debido a la carencia de anticuerpos contra diferentes tipos de VP4 ha limitado la clasificación de los serotipos P (de sensible a proteasa) de VP4. En cambio, las propiedades de VP4 han sido estudiadas por análisis de secuencia y evidencia reciente sugiere la existencia de al menos 20 diferentes genotipos de VP4 (ver tabla 3). Los genotipos de VP4 y VP7 son determinados por análisis de secuencia o hibridación, mientras que los serotipos son determinados por reactividad con anti-suero poli o monoclonal (Estes, 1997).

Serotype	Strain followed by species of origin	
	Human	Animal ^a
1	Wa, KU, RV-4, K8, D, M37, Mont, WI79, AU32, HN-1, GR475/87	Bo/T449, Po/C60, Po/C91, Po/C95, Po/CN117, Po/C86 Po/S7, Po/S8
2	DS-1, S2, RV-5, RV-6, KUN, HN-126, 1076, E201, E210, HU5, TA3, TA20	
3	Ito, YO, P, M, Nemoto, AU-1, RV-3, WI78, AK-35, ST8, MO, McN13, McN14, HCR3, CHW927A, Ro1845, O264, AU228, PA710, O2/92, CH-32, CHW2, CHW17, CH-55, AI-75, J-12, TK08, TK28	Si/SA11 C13, Si/SA11 4fm, Si/SA11-SEM, Si/SA11-F TM , Si/RRV, Ca/K9, Ca/CU-1, Ca/A79-10, Ca/LSU79C-36, Ca/RS15, La/ALA, La/C-11, La/R-2, La/BAP-2, Eq/H-2, Eq/FI14, Eq/HO-5, Eq/69, Eq/124, Eq/K1673, Eq/311, Fe/Cat97, Fe/Cat2, Fe/Cat22, Fe/Taka, Fe/FRV64, Fe/FRV-1, Mu/EW, Mu/EB, Mu/EL, Mu/EC, Mu/EHP, Mu/YR-1, Po/CRW-8, Po/A131, Po/A138, Po/LCA843, Po/A821, Po/A411, Po/BEN-307, Po/PRV 4F, Po/AT76, Ov/LRV1, Po/MDR-13 ^b
4	Hochi, Hosokawa, ST3, 57M, ST4, VA70	Po/Gottfried, Po/SB-1A, Po/SB-2A, Po/BEN-144, Po/BMI-1
5	IAL28 ^c , BR1054	Po/OSU, Po/EE, Po/TFR-41, Po/A34, Po/A46, Po/C134, Po/CC117, Po/S8, Eq/H-1
6	PA151, PA169, MG6	Bo/NCDV-Lincoln, Bo/UK, Bo/B641, Bo/RF, Bo/C486, Bo/WC3, Bo/KN-4, Bo/IND, Bo/BRV033, Bo/B-60, Bo/CR231/39, Ov/LRV2, Cap/Cap455
7		Ch/Ch-2, Ty/Ty-1, Ty/Ty-3, Pi/PO-13, Bo/993/83
8	69M, B37, HAL1166, HAL1271, HMG89	Bo/678, Bo/A5, Bo/NCDV-Cody, Bo/J2538, Eq/26/94
9	WI61, F45, Mc523, AU32, US1205, Mc345, 116E	Po/ISU-64, Po/S8, Ov/LRV
10	I321, Mc35, A28, A64	Bo/B223, Bo/61A, Bo/V1005, Bo/KK3, Bo/B-11, Bo/A44, Bo/CR129, Bo/BR65/255, Eq/R-22, Ov/lp14, Ov/K923
11		Po/YM, Po/A253
12	L26, L27	
13		Eq/L338
14		Eq/FI23, Eq/FR4, Eq/FR5, Eq/FR8, Eq/EQ431, Eq/CH3

^aSpecies of origin of animal strains indicated by abbreviations: Si, simian; La, lapine; Po, porcine; Ca, canine; Mu, murine; Ty, turkey; Ch, chicken; Pi, pigeon; Eq, equine; Fe, feline; Bo, bovine; Ov, ovine; Cap, caprine.

^bPo/MDR-13 has dual serotype reactivity (G3 and G5) (241).

^cHu/IAL28 has dual serotype reactivity (G5 and G11) (362).

Data updated from ref. 104, with permission.

Tabla 2. Serotipos (G) VP7 de rotavirus del grupo A. Tomada de Estes, 1997.

Genotype	Serotype	Strain followed by species of origin	
		Human	Animal ^a
1	6		Bo/C486, Bo/NCDV, Bo/BRV033, Bo/A5, Bo/CR231/39, Bo/J2538, Si/SA11 4fm, Si/SA11-FEM, Eq/26/94, Ov/LRV1
2	5B		Si/SA11 Cl3, Si/SA11-SEM
3	5B 5A	Ro1845, HCR3	Si/RRV, Fe/FRV64 Ca/K9, Ca/CU-1, Ca/RS15, Fe/Cat97
4	1B	RV-5, DS-1, S2, L26, KUN, E210, CHW17	
5	7		Bo/UK, Bo/WC3, Bo/B641, Bo/61A, Bo/678, Bo/V1005, Bo/IND, Po/4S
6	2A 2B	M37, 1076, RV-3, ST3, McN13, US1205	Po/Gottfried, Po/BEN-144, Po/S5, Po/S7, Po/SB-2A
7	9		Po/OSU, Po/TFR-41, Po/C60, Po/A821, Po/A138, Po/YM, Po/A253, Po/BMI-1, Po/AT/76, Po/C95, Po/C134, Po/CC117, Po/SB-1A, Po/CRW-8, Po/BEN-307, Po/A131, Po/EE, Po/ISU-64, Eq/H-1
8	1A	Wa, KU, P, YO, MO, VA70, D, AU32, CH-32, CH-55, CHW2, CH927A, WI61, F45, Ai-75, Hochi, Hosokawa, BR1054	Po/S8, Ov/LRV
9	3	K8, AU-1, PA151, M318, AU228, 02/92	Fe/FRV-1, Fe/Cat2
10	4	69M, 57M	
11	8	116E, I321	Bo/B223, Bo/A44, Bo/KK3, Bo/B-11, Bo/KN-4, Bo/CR129, Bo/BR65/255, Eq/R-22, Ov/LRV2
12	4		Eq/H-2, Eq/FI14, Eq/FI23, Eq/FR4, Eq/FR8, Eq/69, Eq/124, Eq/EQ431, Eq/K311, Eq/K1673
13	13		Po/MDR-13, Po/A46, Po/Clon8
14	11 11?	PA169, HAL1166, Mc35, MG6, GR475/87	La/ALA, La/C-11, La/BAP-2, Cap/Cap455 La/R-2
15			Ov/lp14, Ov/lp16
16	10		Mu/Eb, Mu/EW, Mu/EC
17			Pi/PO-13, Bo/993/83, Ch/Ch-1, Ty/Ty-1, Ty/Ty-3
18	12		Eq/L338
19			Po/4F
20			Mu/EHP

^aSpecies of origin of animal strains indicated by abbreviations: Si, simian; La, lapine; Po, porcine; Ca, canine; Eq, equine; Fe, feline; Bo, bovine; Ov, ovine; Cap, caprine; Ty, turkey; ch, chicken; Mu, murine; Pi, pigeon.

Tabla 3. Genotipos [P] y serotipos (P) de rotavirus.

II. II Estructura de rotavirus.

El esclarecimiento de las características específicas de las partículas de rotavirus se ha basado en el empleo de crio-microscopía electrónica y técnicas de procesamiento de imagen por computadora (Prasad *et al.*, 1988; Prasad *et al.*, 1990; Yeager *et al.*, 1990). Estas técnicas tienen la ventaja de preservar la estructura nativa del virus, sin introducir artefactos potenciales comúnmente asociados con los métodos convencionales de preparación de microscopía electrónica, como la fijación, deshidratación, embebido y tinción. La partícula completa de rotavirus asemeja a una rueda de carreta, con pequeñas espículas y un anillo liso externo bien definido. El nombre “rotavirus” (del Latín *rota*, que significa rueda; ver figura 2) fue sugerido en base a su morfología observada por microscopía electrónica (Flewett *et al.*, 1974). El virión maduro mide aproximadamente 70 nm de diámetro, carece de envoltura lipídica y posee tres capas concéntricas, de composición proteica, y de simetría icosaédrica. La capa externa está constituida por las proteínas VP4 y VP7, donde VP4 sobresale en forma de espículas, proporcionándole una apariencia rugosa al virión maduro (Estes, 1996). La capa intermedia esta compuesta por la proteína VP6 (la más abundante de todas las proteínas estructurales). VP6 contiene los antígenos determinantes de grupo de los rotavirus. Finalmente, la capa interna esta formada por VP2 que engloba a la RNA polimerasa viral VP1 y a la guanililtransferasa y metilasa VP3, que se encuentran en asociación con el genóma viral (Liu *et al.*, 1988).

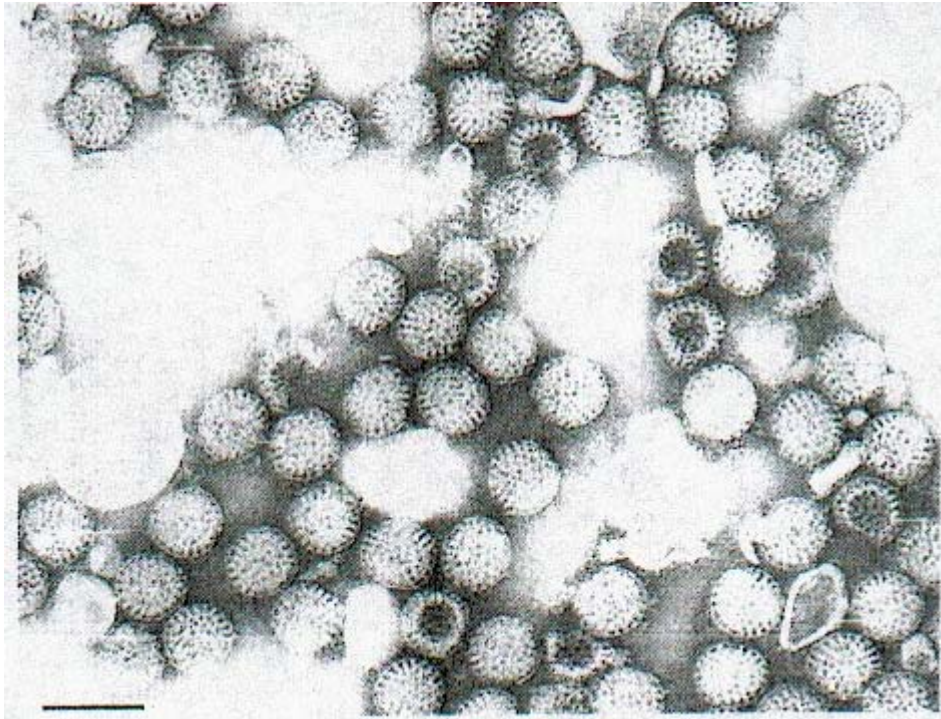


Figura 2. Partículas de rotavirus de humano observadas en un filtrado de heces de un infante con gastroenteritis y sometidas a tinción negativa para microscopía electrónica. Barra: 100 nm. Imagen tomada de Kapikian *et al.*, 1974.

Mediante microscopía crio-electrónica y técnicas de procesamiento de imagen por computadora se determinó que la partícula posee una simetría icosaédrica $T = 13/$ (ver figura 3). Una característica distintiva de la estructura de este virus es que presenta 132 canales acuosos expandidos entre sus capas proteicas, permitiendo conectar el ambiente interno con la superficie externa. Tres tipos de canales pueden ser distinguidos de acuerdo a su posición y tamaño. Doce canales tipo I recorriendo los ejes 5 fold, 60 canales tipo II que se encuentran alrededor de los ejes 5 fold y 60 canales tipo III que se encuentran alrededor de los ejes 3 fold. Los canales tipo III son cerca de 140 Å de largo y cerca de 55 Å de ancho en la superficie exterior del virus. Los otros dos tipos de canales son de dimensiones similares. Los canales están involucrados en importar los metabolitos requeridos para la transcripción de RNA y la exportación de los RNAm nacientes para el subsecuente proceso de replicación.

II. III Genoma de rotavirus.

Los rotavirus presentan un genoma que consiste en 11 segmentos de RNAd contenidos dentro del núcleo ó capa proteica interna (figura 4). Los 11 segmentos de RNAd purificados no son infecciosos, reflejando el hecho de que la partícula viral contiene su propia RNA polimerasa dependiente de RNA para transcribir cada segmento de RNA individual a un activo RNAm. Estudios hidrodinámicos de la flexibilidad de los segmentos de RNA en solución, indican que el empaqueo de estos segmentos de RNA dentro de la cápside de rotavirus requiere interacciones íntimas de RNA-proteína (Kapahnke *et al.*, 1986). Las proteínas directamente responsables del empaqueo aun no han sido identificadas, las proteínas presentes en la capa interna (VP1, VP2, VP3) son obviamente candidatos importantes, aunque las proteínas no estructurales no pueden ser descartadas. El genoma esta altamente ordenado dentro de la partícula, con el 25% del genoma resuelto formando una estructura dodecaedral y VP2 interactuando con el RNA (Labbe *et al.*, 1994; Prasad *et al.*, 1996).

El primer genoma completamente secuenciado fue el de rotavirus de simio SA11 y la secuencia nucleotídica de los 11 segmentos de RNAd de varias cepas de otros rotavirus (humano Ku, bovino RF) es ahora también conocida. La composición de las secuencias de diferentes cepas de rotavirus muestran que entre ellos existen características generales (ver figura 4) en relación a la estructura de cada uno de los segmentos genómicos. Cada segmento de RNA de polaridad positiva inicia con una 5'-guanidina seguida por un set de secuencias conservadas que son parte de las secuencias 5' no-codificantes. Un marco de lectura abierto (ORF del ingles Open Reading Frame) codifica para un producto proteico y termina con el codon de término siguiente, y posteriormente se ubican otras secuencias no-codificantes 3' terminales conservadas, que terminan con dos citocinas 3' terminales. Casi todos los RNAm terminan con la secuencia consenso 5' -UGUGACC- 3', la secuencia contiene señales importantes

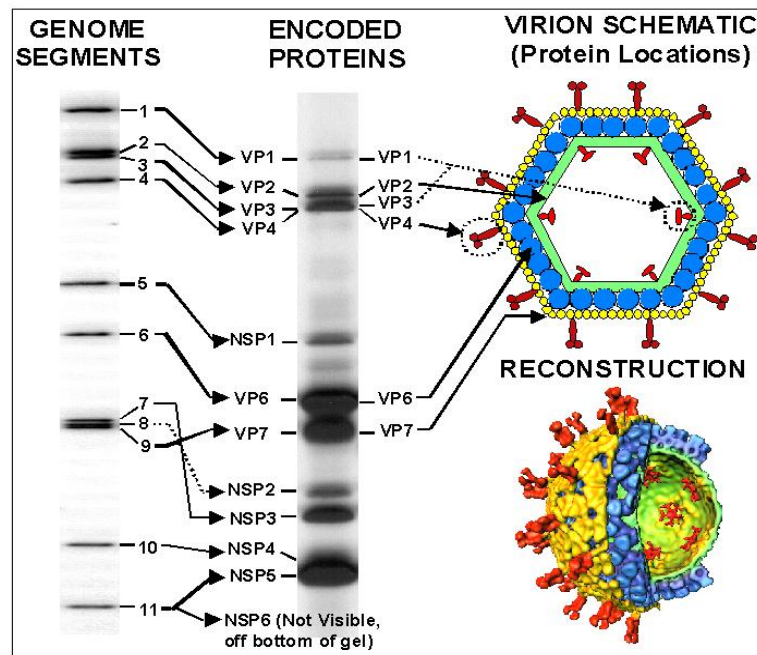


Figura 3. Genoma de rotavirus, proteínas que codifica e imagen del virión. A la izquierda se muestra el patrón electrofóretico de los 11 segmentos de RNAcd y la proteína para la cual codifican. A la derecha se muestra la imagen del virus en la que se ilustran las tres capas proteicas y las proteínas virales que las componen. Imagen proporcionada por Eric Mossel, Mary Estes y Frank Ramig (The RNAs and proteins of dsRNA viruses: Edited by Peter. P. C. Mertens and Dennis H. Bamford).

para la expresión génica y replicación del genoma. La longitud de las secuencias 5' y 3' no-codificantes, varía entre los diferentes genes, y no se ha detectado señal de poliadenilación en el extremo terminal 3' de los genes. Todos los genes secuenciados poseen por lo menos un marco abierto de lectura después del primer codon de iniciación. Este es usualmente un codon de iniciación fuerte, basados en las reglas de Kozak (Kozak, 1986). Aunque algunos de los genes poseen adicionales marcos abiertos de lectura dentro de fase (genes 7, 9 y 10), ó fuera de fase (gen 11), la evidencia generada hasta este momento, es que todos los genes son mono-cistronicos, excepto el gen 11 (Mattion *et al.*, 1991). Los últimos cuatro nucleótidos de los RNAm pueden funcionar como “enhancer” (favorecedores) de la traducción (Chizhikov and Patton, 2000).

La secuencia de los genes de rotavirus son ricas en A + U (de 58 a 67%). Los segmentos de RNAd están apareados base a base hasta el final, y la cadena positiva contiene una secuencia cap m⁷GpppG^(m)GPy en su extremo 5' (Imai *et al.*, 1983; McCrae and McCorquodale, 1983). Características similares también se han observado en la estructura primaria de los segmentos genómicos de otros virus (reovirus, virus de la polihedrosis citoplásmica, orbivirus) en la familia *Reoviridae* y en otras familias virales con genoma segmentado (*Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae*, y *Bunyaviridae*). Uno de los aspectos más intrigantes de rotavirus y de todos los virus con genoma segmentado, es como estos virus coordinan la replicación y empaquetado de los 11 RNAd virales. Los 11 RNAm deben compartir señales que actúen en cis, ya que todos ellos son replicados por la misma polimerasa, y estas señales podrían formar por estructura secundaria más que por secuencia primaria. Además, cada RNAm debe contener por lo menos una señal que es única, ya que los 11 RNAm deben ser diferenciados uno de otro durante el empaquetado. Generalmente, la secuencia terminal conservada en los segmentos genómicos contiene señales que actúan en cis, que son importantes para transcripción, traducción del RNA, transporte del RNA, replicación, ensamble, ó encapsidación de los segmentos virales. Algunas

de las señales que actúan en cis para la replicación y traducción del RNAm de rotavirus han sido ya identificadas (figura 4), pero señales para la encapsidación selectiva y ensamble viral aun son desconocidas (Patton and Spencer, 2000).

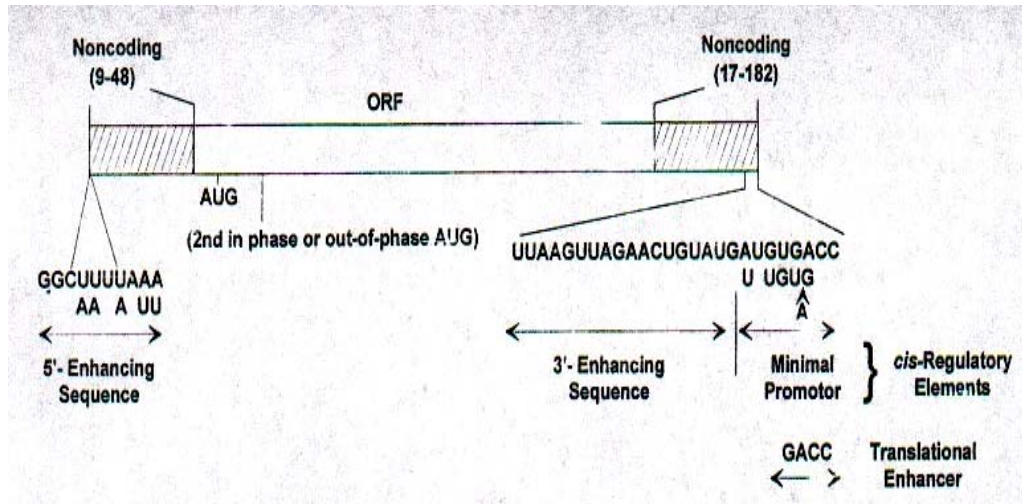


Figura 4. Estructura de los RNAm de rotavirus. En la parte central de los RNAm se encuentra el marco de lectura abierto (ORF), y a los extremos de éste secuencias no traducidas que son importantes para la regulación de la transcripción, traducción y replicación.

Los rotavirus son los únicos agentes conocidos de mamífero y ave que contienen 11 segmentos de RNAcd. En la mayoría de los casos el patrón electrofóretico del genóma de los virus del grupo A esta compuesto por 4 segmentos de RNAcd de gran tamaño molecular (1-4), dos segmentos de tamaño medio (5 y 6), un triplete distintivo de segmentos (7, 8 y 9), y dos segmentos más pequeños (10 y 11). Cuando este patrón básico no es visualizado, los rotavirus podrían no pertenecer al grupo A, sino a un virus de ave del grupo A, o bien a un virus del grupo A que tiene rearrglantes genéticas con segmentos genómicos individuales (figura 5). Los análisis electrofóreticos de los segmentos genómicos son relativamente fáciles, rápidos y comúnmente utilizados para estudios epidemiológicos para monitorear brotes y epidemias.

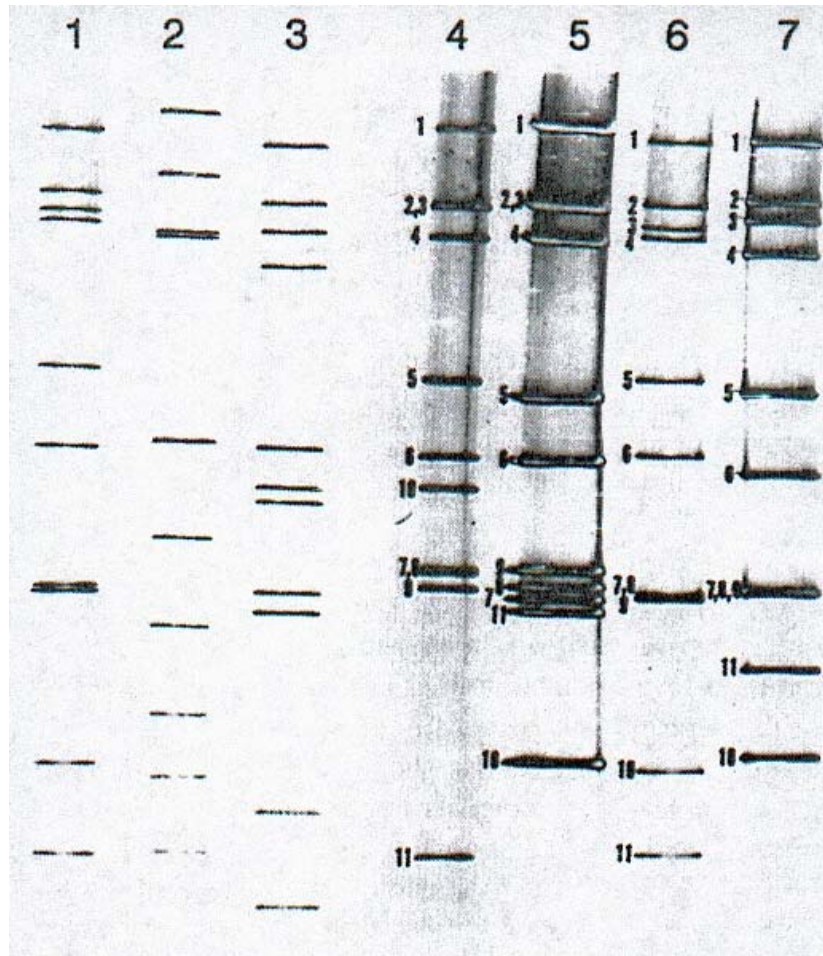


Figura 5. Patrón electrofóretico de los segmentos de RNAd de rotavirus. Los 11 segmentos fueron separados por electrofóresis en un gel de poliacrilamida al 10 % y visualizados con tinción de nitrato de plata. Se muestra el patrón de RNA de rotavirus del grupo A (SA11, línea 1), rotavirus del grupo B (aislado de diarrea de un adulto en China, línea 2), y un rotavirus del grupo C (rotavirus porcino, línea 3). Se muestra también patrón de tres rearreglantes genéticas de cepas de rotavirus de conejo (C11, línea 4; Ala, línea 5; y R2, línea 7) y sus segmentos homólogos son comparados con los de SA11 (línea 6). Figura tomada de Tanaka *et al.*, 1988.

La hibridación de ácidos nucleicos, así como Northern blot son dos técnicas utilizadas para clasificar virus basándose en la relación de los segmentos genómicos, e identificar el origen de segmentos de RNA específicos en virus rearreglantes. Esta metodología ha sido útil para caracterizar virus posiblemente involucrados en transmisión entre especies diferentes (Nakagomi O. and Nakagomi T., 1991; Nakagomi O. and Nakagomi T., 1993).

En virus con genoma rearreglante, segmentos de RNA típicos desaparecen ó disminuyen en su concentración en un perfil electrofórico, y estos son remplazados por segmentos adicionales migrando más lentamente o en forma atípica (figura 5). Las bandas que migran más lentamente representan formas concataméricas del RNAc conteniendo secuencias específicas para los segmentos de RNA faltantes (Desselberger, 1996). Las bandas que migran más rápidamente parecen representar delecciones. Virus con genoma rearreglante de este tipo han sido aislados de niños inmunodeficientes (Hundley *et al.*, 1987), niños infectados crónicamente (Pedley *et al.*, 1984) y de diferentes especies animales (Pocock, 1987; Bellinzoni *et al.*, 1987).

Virus aislados y caracterizados que contienen segmentos genómicos rearreglantes, no son generalmente defectuosos. Los segmentos rearreglantes pueden reemplazar a los segmentos de RNA normales, estructural y funcionalmente (Allen and Desselberger, 1985; Biryahwaho *et al.*, 1987; Graham and Estes, 1985).

En la mayoría de los casos, las rearreglantes resultan de la duplicación de estructuras “cabeza-tallo” que ocurren inmediatamente corriente abajo del marco abierto de lectura normal, lo cual explica que el segmento rearreglante retiene la capacidad de expresar su producto proteico completo.

II. IV Proteínas de rotavirus.

Cada segmento de RNA codifica por lo menos para una proteína. La asignación de que proteína codifica cada segmento se ha logrado empleando técnicas de traducción *in vitro*, de RNAm o RNAd desnaturalizado como templado. La información sobre los procesos de traducción de cada uno de los RNAs del virus SA11 fue la primera en haberse descrito, de tal forma que este virus se ha convertido en el prototipo de la familia.

Los segmentos genómicos de rotavirus codifican para proteínas estructurales encontradas en las partículas virales y proteínas no estructurales encontradas en células infectadas, pero no presentes en la partícula madura. Los genes 5, 7, 8, 10 y 11 codifican para proteínas no estructurales las cuales son conocidas como NSP1-NSP6. Los genes del 1 al 4, 6 y 9 codifican para proteínas estructurales VP1-VP4, VP6 y VP7 respectivamente (Liu, *et al.*, 1988; Mata, *et al.*, 1983).

II. IV. I Proteínas estructurales.

VP1. Es el producto del gen 1, es la RNA polimerasa viral dependiente de RNA y tiene un peso molecular aparente de 136 kDa, generalmente se ubica en los viroplasmos de células infectadas por rotavirus (Petrie *et al.*, 1982; Fang, *et al.*, 1989). Análisis de la secuencia del gen 1, indican que este gen es altamente conservado. Todas las secuencias de VP1 comparten los cuatro dominios conservados en las secuencias de todas las polimerasas mostrando especificidad por templado de RNA (Poch *et al.*, 1989). La secuencia de amino ácidos revela que VP1 es básica, con una carga neta positiva a pH 7. VP1 requiere de la presencia de VP2 para tener actividad de

RNA polimerasa, y de VP3 y VP6 para tener actividad de transcriptasa (Mansell y Patton, 1990; Wentz *et al.*, 1995).

VP2. Es el principal componente de las partículas “core” (núcleo) y se estima que estas partículas contienen 200 moléculas de VP2, teniendo un peso molecular de 104 kDa. Se une a ácidos nucleicos en una forma no específica de secuencia (Boyle and Holmes, 1986). Análisis de secuencia señalan que VP2 posee dos dominios presentes en proteínas que se unen a ácidos nucleicos. Dos “zippers” de leucinas localizados en los amino ácidos 536 y 686 y que podrían estar implicados en la dimerización de VP2 y favorecer la unión a ácidos nucleicos. La región entre los amino ácidos 65 y 120 se cree que posee una estructura secundaria de hélice-vuelta-hélice, dominio encontrado en varias proteínas de unión a DNA (Garnier *et al.*, 1978; Estes and Cohen, 1989). Es una proteína rica en prolina (>3.6%) y la mayoría de estos residuos son conservados (Estes and Cohen, 1989). Durante la infección por rotavirus, VP2 ha sido ubicada en los viroplasmos al igual que VP1 (Petrie *et al.*, 1982).

VP3. Producto del segmento genómico 3, es una proteína básica y es un componente menor del core (núcleo) del virión maduro (Liu *et al.*, 1988). Esta proteína viral se ubica en los viroplasmos de las células infectadas (Petrie *et al.*, 1982). Varios estudios han reportado que VP3 se une específicamente a GTP y que esta interacción es covalente y reversible (Fukuhara *et al.*, 1989; Pizarro *et al.*, 1991), esta interacción fue demostrada en la ausencia de otras proteínas de rotavirus. Estos datos son consistentes con el hecho de que VP3 tiene actividad de guanililtransferasa dependiente de magnesio como cofactor (Pizarro *et al.*, 1991). Posteriormente se demostró que además de adicionar el cap a los RNAm nacientes, VP3 tiene la capacidad de metilarlo (Chen *et al.*, 1999). Por lo tanto, VP3 es una enzima multifuncional que adiciona cap a los RNAm de rotavirus.

VP4. Es una proteína no glicosilada de la capa proteica externa, que forma espuelas que se extienden desde la superficie de la capa proteica externa, proporcionándole una apariencia rugosa al virion (Prasad *et al.*, 1988; Yeager *et al.*, 1990). VP4 ha sido implicada en varias funciones importantes, tales como la penetración a la célula huésped, hemaglutinación, neutralización, y virulencia. Esta proteína de superficie induce anticuerpos neutralizantes, permitiendo definir serotipos que se han denominado “serotipos P” (de susceptible a proteasa). La entrada de rotavirus a la célula huésped es favorecida en gran medida por la tripsinización del virus, lo cual divide a VP4 en dos polipéptidos VP8 y VP5. El corte de VP4 no afecta la unión a la célula huésped (Kapikian *et al.*, 2001).

VP6. Estudios de crio-microscopía electrónica de alta resolución han revelado que la capa proteica intermedia, esta constituida por 260 columnas triméricas atribuidas a VP6 (Prasad *et al.*, 1988; Yeager *et al.*, 1990). VP6 es la proteína mas abundante del virión maduro, generalmente ubicada en los viroplasma de células infectadas y es requerida para la actividad de transcripción (Bican *et al.*, 1982; Petrie *et al.*, 1984). VP6 juega un papel crucial en el ciclo de rotavirus, participando en la formación del virión y en la activación de la transcripción viral. La estructura de VP6 consiste en 2 dominios, llamados; la base y la cabeza. Un ion de zinc ocupa la parte central del trímero de VP6 (Mathieu *et al.*, 2001). VP6 contiene los antígenos de grupo detectados por los ensayos de diagnóstico (Kapikian *et al.*, 1981)

VP7. Constituye la capa externa lisa de los viriones maduros. Estudios utilizando crio-microscopía electrónica han confirmado que la capa externa de rotavirus consiste de 780 moléculas de VP7 arregladas alrededor de 132 canales acuosos (Prasad *et al.*, 1988; Yeager *et al.*, 1990). VP7 es una glicoproteína que contiene solamente residuos de oligosacáridos de alta manosa, modificación post-traduccional llevada a cabo en el Retículo Endoplásmico (R. E.) (Estes y Cohen, 1989). VP7 es una proteína integral de membrana con una orientación luminal, la cual es traducida por

ribosomas asociados al R. E. y subsecuentemente es translocada dentro del lumen del R. E. VP7 es una proteína altamente inmunogénica e induce anticuerpos neutralizantes y específicos de serotipo. Un total de 14 diferentes serotipos de VP7 (tipo G, de glicoproteína) han sido identificados, incluyendo rotavirus de especie humano y animal (Estes and Cohen, 1989). VP7 ha sido propuesta como la proteína de adhesión celular (Fukuhara *et al.*, 1988; Sabara *et al.*, 1985).

II. IV. II Proteínas no-estructurales.

NSP1. Es el producto del gen 5, con un peso molecular de 58 kDa es expresada en bajos niveles en la célula infectada. Mediante el uso de ensayos de inmunofluorescencia indirecta se ha determinado que NSP1 no se acumula en los viroplasma, sino a través de todo el citoplasma de la célula infectada en forma puntual (Hua and Patton, 1994). Se ha sugerido una posible interacción de NSP1 con el citoesqueleto de las células infectadas con base en experimentos de fraccionamiento celular, en los que se ha observado que NSP1 es aislada de la fracción de la matriz del citoesqueleto (Hua and Patton, 1994). Su secuencia primaria es pobremente conservada, especialmente en la porción carboxilo terminal. Cerca de su extremo amino, NSP1 contiene una secuencia rica en cisteínas (Mitchell and Both, 1990a; Hua *et al.*, 1993; Dunn *et al.*, 1994; Palombo and Bishop, 1994; Xu *et al.*, 1994). Este dominio podría contener dos “dedos de zinc”, dominios frecuentemente asociados con unión a ácidos nucleicos (Lovering *et al.*, 1993). NSP1 se une en forma específica al extremo 5' de los 11 RNAm de rotavirus (Hua *et al.*, 1994).

En algunas variantes de rotavirus se han identificado rearrreglantes en el gen 5 que no codifican a la proteína NSP1 completa, pero aun retienen la capacidad de replicar en cultivo celular (Hundley *et al.*, 1985; Tian *et al.*,

1993; Hua and Patton, 1994). Recientemente se ha demostrado que NSP1 se une al factor regulador de interferón 3, (IRF-3), y de esta forma interfiere con la respuesta inmune del huésped (Barro and Patton, 2005).

NSP2. Es el producto del gen 8, con un peso molecular de 34 kDa y es la proteína más abundante de los viroplasmos (Petrie *et al.*, 1984). NSP2, la forma funcional de NSP2 es octamérica, se une a RNAm en forma independiente de secuencia (Kattoura *et al.*, 1992; Kattoura *et al.*, 1994). Mutantes sensibles a temperatura de NSP2 fallan en replicar el genoma, en formar viroplasmos y producen principalmente partículas virales vacías, indicando que NSP2 participa en replicación y empaquetamiento del genoma (Raming and Petrie, 1984; Chen *et al.*, 1990). NSP2 posee actividad de NTPasa dependiente de magnesio y actividad desestabilizadora de hélice (Taraporewala *et al.*, 2001). Basado en estas propiedades, se ha sugerido que NSP2 podría funcionar como un motor molecular que usa la energía liberada de la hidrólisis de los NTPs para empaquetar el genoma viral (Shuck *et al.*, 2001). Estudios de entrecruzamiento químico han demostrado que en células infectadas existen complejos NSP2-VP1 (Kattoura *et al.*, 1994). Dado que ambas proteínas se acumulan en los viroplasmos, este podría ser el sitio donde los complejos se forman. NSP2 interactúa adicionalmente con NSP5, jugando un papel esencial en la hiperfosforilación de NSP5 (Afrikanova *et al.*, 1998). Cuando se co-expresan NSP2 y NSP5 en células, en la ausencia de otras proteínas virales, se forman estructuras similares a los viroplasmos (VLS) (Fabretti *et al.*, 1999). Esto sugiere que la interacción entre NSP2 y NSP5 podría ser uno de los eventos iniciales en la formación de los viroplasmos de rotavirus.

NSP3. Producto del segmento de RNAd 7, posee un peso molecular de 34 kDa y se encuentra en una concentración moderada en células infectadas. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta han mostrado que NSP3 se distribuye de una forma filamentosa en el citoplasma, sugiriendo

una posible asociación con el citoesqueleto (Mattion *et al.*, 1992). Estudios de fraccionamiento celular muestran, al igual que sucede con NSP1, la mayoría de NSP3 co-purifica con la matriz del citoesqueleto (Mattion *et al.*, 1992; Hua *et al.*, 1994). NSP3 forma dímeros que se unen en forma específica al extremo 3' de los RNAm de rotavirus y que esta interacción los protege de digestión por RNAsas (Mattion *et al.*, 1992; Poncet *et al.*, 1993). Mediante mutagénesis dirigida se ha determinado que la secuencia GACC del extremo 3' terminal, es la secuencia mínima para la interacción específica entre el RNAm viral y NSP3 (Poncet *et al.*, 1994).

NSP4. Es la glicoproteína transmembranal codificada por el RNAcd 10. El producto primario de este gen es de 175 amino ácidos, que posteriormente es glicosilado en las asparaginas 8 y 18 resultando en una proteína de 28 kDa (Both *et al.*, 1993; Baybutt and McCrae, 1984; Powell *et al.*, 1988; Okada *et al.*, 1984). Tres dominios hidrofóbicos están presentes en el extremo amino de NSP4, el cual es postulado para ser retenido en la membrana del R.E.. La región amino terminal glicosilada esta orientada sobre el lado luminal del R.E., mientras que el extremo carboxilo, el cual es el más hidrofílico, se extiende hacia el citoplasma celular. NSP4 ha sido asociada con la maduración de partículas por gemar a través de las membranas del R. E. (Au *et al.*, 1989; Bergmann *et al.*, 1989). La glicosilación de NSP4 ha sido reportada necesaria para la disolución de membrana y final maduración de los viriones en el R. E., pero el mecanismo es desconocido (Petrie *et al.*, 1981). NSP4 también actúa como una toxina, esto es que la sola administración a ratones es capaz de producir diarrea (Ball *et al.*, 1996; Newton *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 1995), además de unirse a los microtubulos e interferir con el transporte intracelular de proteínas de R E a Golgi (Xu *et al.*, 2000).

NSP5. Es el producto del RNAcd 11 de 198 amino ácidos, con un peso molecular estimado de 26 kDa. Se han reportado dos tipos de modificación post-traducciona para NSP5, O-glicosilación y fosforilación (Gonzalez and

Burrone, 1991; Welch *et al.*, 1989). Durante la infección por rotavirus, NSP5 es localizada en los viroplasmos desde 2-3 horas post-infección, aunque su función aun no ha sido esclarecida (Petrie *et al.*, 1984). La secuencia primaria de NSP5 se caracteriza por un alto contenido de serina y treonina (24%). NSP5 presenta diferentes estados de fosforilación, dando lugar a varias isoformas que van desde los 26, 28 y 32-34 kDa (Afrikanova *et al.*, 1996). NSP5 interacciona con VP1 y con NSP2, esta última jugando un papel esencial en la hiperfosforilación de NSP5 (Afrikanova *et al.*, 1998).

NSP6. Es codificada por el segmento 11, al igual que NSP5, pero como un segundo marco de lectura abierto, corriente abajo del inicio del marco de NSP5. NSP6 tiene un peso molecular de 11 kDa y su función durante la infección es desconocida. Previamente fue demostrado que NSP6 se une al extremo carboxilo de NSP5, sugiriendo un posible papel en la regulación de la dimerización de NSP5 (Torres-Vega *et al.*, 2000).

Capítulo III Replicación de rotavirus.

Aunque el tropismo celular natural para rotavirus es el enterocito diferenciado en el intestino delgado, la replicación de rotavirus ha sido principalmente estudiada en cultivos celulares continuos derivados de Riñón de mono. En estas células, el ciclo de replicación es rápido, donde el punto máximo de virus generado se da después de las 10 a 12 horas post-infección a 37 °C, cuando las células son infectadas con multiplicidades altas (10-20 UFP/célula) (Clark *et al.*, 1980; Offit *et al.*, 1986; Ramig, 1982). Estudios con microscopía electrónica de la replicación del virus en células intestinales polarizadas, indican que el proceso de replicación en estas células tiene algunas diferencias comparado con el ciclo de replicación en cultivos de células no polarizadas.

Las características generales de la replicación de rotavirus (basadas en estudios con cultivos celulares de riñón de mono) son las siguientes:

1. El cultivo de la mayoría de las cepas de rotavirus requiere la adición de proteasas exógenas al medio de cultivo. Esto asegura la activación de la infectividad viral por cortar la proteína VP4 de la cápside externa.
2. La replicación es citoplasmática.
3. Las enzimas para replicar el RNACd son virales.
4. Los transcritos funcionan tanto para producir proteínas virales, como cadena molde para la producción de la cadena de polaridad negativa. Una vez sintetizada dicha cadena, por complementación permanece asociada a la cadena de polaridad positiva.
5. Los segmentos de RNACd son formados dentro de partículas subvirales nacientes, y RNACd nunca se ha encontrado libre en el citoplasma.
6. Las partículas subvirales se forman en asociación con los viroplasmos, y estas partículas maduran por gemación a través de la

membrana del R E. En este proceso, las partículas adquieren su capa proteica externa.

7. Las partículas maduras se liberan de células infectadas cultivadas en monocapas mediante lisis celular.

En células intestinales polarizadas, la entrada del virus ocurre casi exclusivamente a través de la membrana apical ó a veces de la basolateral, dependiendo de la cepa viral. Además, la replicación viral en los enterocitos polarizados, altera la función celular de los enterocitos diferenciados por perturbar el transporte intracelular de proteínas, el citoesqueleto y uniones estrechas (Brunet *et al.*, 2000; Jourdan *et al.*, 1998; Obert *et al.*, 2000). Finalmente, el virus es liberado del enterocito polarizado por un nuevo transporte vesicular que no resulta en efectos citopáticos extensos (Jourdan *et al.*, 1997).

III. I Etapas del ciclo de replicación de rotavirus.

III. I. I Adsorción, penetración y pérdida de la capa externa.

Las etapas iniciales de la replicación de rotavirus han sido analizadas por procedimientos bioquímicos y morfológicos (microscopía electrónica) con los cuales se ha revelado que los eventos tempranos de la infección de rotavirus son complejos (figura 6). Solamente partículas de triple capa conteniendo VP4 se adhieren a las células, según se ha determinado en ensayos de unión (Crawford *et al.*, 1994) o por ensayos de infectividad (Bridger and Woode, 1976), determinando que la adhesión del virus a la célula es mediada por VP4 (Ruggeri and Greenberg, 1991; Crawford *et al.*, 1994) o sus productos de corte (Zarate *et al.*, 2000). La entrada de rotavirus a las

células parece ser un proceso que involucra varios pasos que requiere de la participación tanto de VP4 como de VP7 (Mendez *et al.*, 1999).

La identidad del receptor celular para los rotavirus no es conocido, sin embargo se piensa que es una molécula muy abundante en la superficie celular, ya que mediante ensayos de unión con el rotavirus SA11 marcado radiactivamente a células MA104 (de riñón de mono) se encontraron cerca de 13, 000 unidades receptoras por célula. La unión inicial es de sodio dependiente, y dependiente de residuos de ácido siálico sobre la membrana; el virus se une, pero no es internalizado a 4°C (Fukudome *et al.*, 1989; Keljo *et al.*, 1988; Petrie *et al.*, 1981; Willoughby *et al.*, 1990) ya que probablemente para ellos se requiere de más de una especie molecular sobre la célula (Srnska *et al.*, 1992). Se ha reportado que una glicoproteína de 300–340 kDa de enterocitos murinos se une a rotavirus de mono y a VP4, pero aun se desconoce si ésta proteína corresponde a un receptor debido a que el extracto del enterocito era crudo y no había sido purificado ni sometido a ensayos de competencia por la unión al enterocito íntegro (Bass *et al.*, 1991).

La entrada de rotavirus al enterocito maduro parece involucrar interacción de las proteínas de superficie VP4 y VP7 con diferentes moléculas de superficie celular (López and Arias, 2004). El ácido N-acetilneuraminico, mejor conocido como ácido siálico, es requerido por algunas cepas de rotavirus de animal para adherirse a la superficie del enterocito y la infectividad de estas cepas es disminuida por el tratamiento previo de las células con neuraminidasa (la cual elimina al ácido siálico). Sin embargo, la mayoría de las cepas de rotavirus de humano y muchas de animal son resistentes al tratamiento con neuraminidasa, es decir, no parecen requerir ácido siálico para adherirse a la célula (Ciarlet *at al.*, 1999). El que estas cepas de rotavirus no necesiten el ácido siálico para adherirse a la célula en condiciones estáticas, no significa que tal vez si lo requieran en el intestino dentro de un ambiente dinámico. Se ha sugerido que el gangliósido GM3

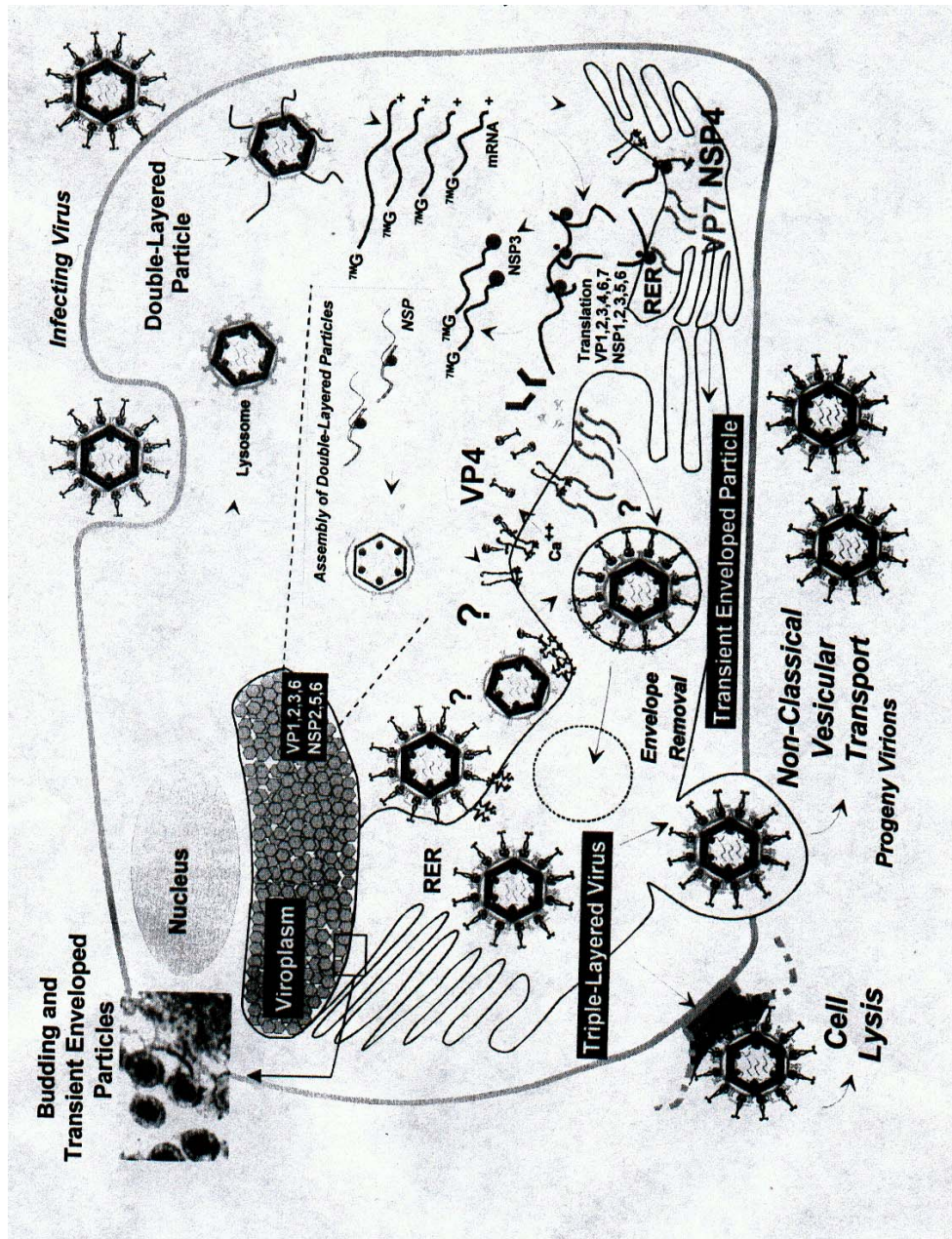


Figura 6. Principales características del ciclo de replicación de rotavirus. El virus entra a la célula, posiblemente por fagocitosis mediada por receptor, proceso en el cual se pierde la capa externa del virus y se activa la actividad de transcriptasa. Los RNAm virales pueden ser traducidos o bien servir como cadena molde para la replicación del genoma, proceso que se da en forma simultánea con el ensamble de la partícula viral. La maduración final de la partícula viral se da en el interior del retículo endoplasmático donde además de adquirir la capa externa, se añade una membrana lipídica transitoria y el virus sale de la célula ya sea por lisis celular o bien por un transporte vesicular no clásico.

sirve como el receptor que contiene ácido siálico durante la entrada del rotavirus porcino OSU (Rolsma *et al.*, 1998), mientras que el gangliósido GM1 (resistente a neuraminidasa) a sido descrito como el posible receptor para las cepas de rotavirus de humano KUN y MO (Guo *et al.*, 1999).

Recientemente, varias integrinas han sido implicadas como receptores. La proteína VP4 de rotavirus contiene dominios de unión para las integrinas $\alpha\beta1$ y $\alpha4\beta1$, mientras que VP7 contiene sitios de unión para las integrinas $\alpha\beta2$ y $\alpha4\beta1$ (Coulson *et al.*, 1997; Hewish *et al.*, 2000). Anticuerpos o péptidos dirigidos contra estas integrinas bloquean la infectividad de rotavirus tanto de cepas sensibles como resistentes a neuraminidasa (Graham *et al.*, 2003; Ciarlet *et al.*, 2002; Zárate *et al.*, 2000; Guerrero *et al.*, 2000). La integrina $\alpha V\beta3$ también a sido involucrada en la entrada de varias cepas de rotavirus pero en un paso post-adhesión (Graham *et al.*, 2003; Guerrero *et al.*, 2000). La proteína de choque térmico de superficie celular hsc70 también se ha propuesto como un receptor post-adhesión de rotavirus tanto de cepas sensibles como resistentes a neuraminidasa (Guerrero *et al.*, 2002), aunque los detalles moleculares de estas interacciones aun se desconocen.

Después de la unión, el virus es internalizado. La infectividad de rotavirus aumenta por proteólisis con tripsina, debido a que facilita el paso de la penetración (Clark *et al.*, 1981). La internalización no tiene lugar de 0 a 4 °C, indicando que este paso requiere un proceso celular activo (Keljo and Smith, 1988; Petrie *et al.*, 1981). Todos los virus son internalizados en 60-90 minutos después de la unión a las células blanco (Keljo and Smith, 1988). El mecanismo de internalización (penetración) aun es controversial.

Estudios con microscopía electrónica han sugerido que el virus entra mediante endocitosis (Petrie *et al.*, 1981; Quan and Doane, 1983) y que las partículas entrantes son rápidamente transportadas a lisosomas. Evidencia del virus tratado con tripsina dentro de vacuolas endocíticas, y lisosomas

secundarios por microscopía electrónica sugiere que las partículas de rotavirus (cepa OSU de porcino) entra a las células por endocitosis mediada por receptor, y sugiere que la pérdida de la capa externa de los viriones es debida a la presencia de las enzimas lisosomales (Ludert *et al.*, 1987). Sin embargo, se ha reportado que la infectividad por rotavirus no es inhibida ya sea por prevenir la acidificación de los endosomas o por drogas que bloquean el transporte intracelular mediado por vesículas endocíticas (Estes, 2001). La penetración directa de la membrana celular también se ha postulado como el posible mecanismo de entrada de rotavirus al enterocito basados en datos de microscopia electrónica y sobre la observación de que la infección por rotavirus induce una rápida permeabilización de membrana celular (Estes, 2001). Un dominio hidrofóbico de VP5 (producto proteolítico de VP4) que permeabiliza membranas modelo o bacteriana s sido propuesto en este proceso (Denisova, *et al.* 1999; Dowling *et al.*. 2000).

Recientemente un modelo de endocitosis dependiente de calcio fue propuesto para la entrada de rotavirus a la célula, basado en la observación de que VP4 y VP7 son capaces de permeabilizar membranas (Charpilienne *et al.*, 1997) y que bafilomicina A, una droga que inhibe la bomba de ATP endosomal, bloquea la infección por rotavirus (Chemello *et al.*, 2002). En este modelo, el virus es internalizado dentro de vesículas endocíticas cubiertas de clatrina; dentro de estas vesículas una disminución de la concentración de calcio, promovida por una bomba de ATP endosomal solubiliza las proteínas de superficie de la partícula viral. Las proteínas de la capa externa del virus ya solubilizadas entonces permeabilizarían la membrana de la vesícula para liberar al citoplasma la partícula de doble capa transcripcionalmente activa (Chemello *et al.*, 2002).

III. I. II Transcripción, traducción y replicación de rotavirus.

La síntesis de transcritos virales es regulada por una RNA polimerasa dependiente de RNA endógena (transcriptasa), la cual tiene varias actividades enzimáticas. La transcriptasa es un componente del virión, esta formada por VP1, VP2, VP3, y VP6. Además de la actividad de transcriptasa, posee actividad de nucleótido fosfohidrolasa, guanililtransferasa y metilasa (Pesavento *et al.*, 2006).

La transcriptasa asociada al virus esta latente en las partículas de triple capa y puede ser activada *in vitro* por tratamiento con un agente quelante o por tratamiento con choque térmico (Cohen *et al.*, 1979; Spencer and Arias, 1981). Dichos tratamientos resultan de la eliminación de la capa proteica externa, dando como producto partículas de doble capa (Cohen *et al.*, 1979). En células infectadas, se ha demostrado que las partículas de triple capa se convierten a partículas de doble capa, y es en estas partículas donde se lleva a cabo la transcripción (Clark *et al.*, 1980). Consistente con esta idea, las células pueden ser infectadas al ser transfectadas con partículas de doble capa, indicando que su simple liberación al citoplasma hace que la transcripción proceda (Bellamy and Both, 1990). La transcripción es asimétrica, y todos los transcritos son cadenas positivas sintetizadas a partir de la cadena de polaridad negativa del RNACd (McCrae and McCorquodale, 1983). El sitio exacto de la transcripción dentro del citoplasma no ha sido precisamente localizado, aunque se cree que ocurre en los viroplasmos, estructuras constituidas de proteínas y RNA viral.

La transcripción ocurre dentro de las partículas de doble capa, proceso que requiere ATP (Spencer and Arias, 1981). Los RNAm nacientes son expulsados de la capa interna mediante los canales tipo I, y múltiples transcritos pueden ser liberados simultáneamente de una partícula transcribiendo activamente (Lawton *et al.*, 1997).

Se desconocen los mecanismos moleculares que regulan la transcripción y la subsiguiente traducción de los genes de rotavirus. Estudios en los que se midió los niveles de los transcritos virales y las proteínas codificadas, sugieren un control cuantitativo y temporal de la expresión de los genes de rotavirus (Jonson and McCrae 1989). Se encontró que las 11 proteínas virales no son sintetizadas en niveles equivalentes en células infectadas por rotavirus y tampoco correspondía el nivel de proteína encontrado cuando se comparaba con el nivel de su transcrito correspondiente. Estas observaciones sugieren dos tipos de control; transcripcional y traduccional en la expresión de los genes virales.

Existen pocos reportes abordando el estudio de la traducción de los genes de rotavirus, sin embargo recientemente se reporto que la proteína NSP3 de rotavirus interacciona con el factor de la iniciación de la traducción eIF4G1 (Piron *et al.*, 1998). eIF4G1 es un componente del complejo de iniciación eIF4F el cual se une al cap 5' de los RNAm eucarioticos. La interacción entre NSP3 y eIF4G1 probablemente promueva la circularización de los RNAm virales favoreciendo la traducción (Piron *et al.*, 1998; Vende *et al.*, 2000).

Análisis de la cinética de la síntesis de RNA en células infectadas muestran que tanto los RNA de polaridad positiva como negativa son detectables desde las 3 horas post-infección (Stacy-Phipps and Patton, 1987). Después de las 3 horas, el nivel de transcripción aumenta hasta las 9-12 horas, tiempo en el cual los niveles de RNA de polaridad positiva son máximos. El rango de síntesis de RNA de polaridad positiva o negativa cambia durante la infección, y el nivel máximo de RNA de polaridad negativa se alcanza horas después del nivel máximo de síntesis de RNA de polaridad positiva.

Tanto las cadenas de RNA de polaridad positiva sintetizadas de novo, como las pre-existentes pueden funcionar como molde para la síntesis de las

cadenas de polaridad negativa (Patton, 1986). La observación de que el nivel de replicación del RNA no correlaciona con el incremento en los niveles de RNA de polaridad positiva, sugiere que la replicación del RNA es regulada por otros factores, más que simplemente por el aumento en la cantidad de RNA de polaridad positiva en la célula infectada.

La replicación de rotavirus, al igual que la de reovirus, ocurre en forma conservativa; esto es, ambas cadenas parentales del RNACd permanecen dentro de la partícula parcialmente descubierta. Después de su síntesis, el RNACd permanece asociado con partículas subvirales, sugiriendo que el RNACd libre, nunca está presente en la célula infectada. La caracterización de partículas subvirales aislados de células infectadas (complejos separables por sedimentación, a través de gradientes de sacarosa), en los que ocurre la síntesis de RNACd, consisten de las proteínas VP1 y VP2, pequeñas concentraciones de VP6, NSP3, NSP1 y NSP2 (Helmberger-Jones and Patton, 1986). Esto sugiere que algunas de las proteínas no estructurales podrían estar involucradas en la replicación del RNA.

Un modelo ha sido propuesto en el cual partículas de doble capa de rotavirus son ensambladas, por adición secuencial de VP2 y VP6 a un pre-núcleo (capa interna) que consistiría de VP1, VP3, VP2, NSP2, NSP3 y NSP5 (Gallegos and Patton, 1989).

Mediante un sistema de replicasa *in vitro*, empleando partículas subvirales (Chen *et al.*, 1994), al cual se añadían RNAm conteniendo deleciones en la secuencia consenso del extremo 3', 5'-UGUGACC- 3', se determinó que esta secuencia contiene señales que actúan en cis que son esenciales para la síntesis de RNA de polaridad negativa (Patton *et al.*, 1996; Wentz *et al.*, 1996). De igual manera, secuencias corriente arriba de la secuencia consenso en el extremo 3' terminal, se ha determinado que contribuyen a la eficiencia de la síntesis de RNACd en estos sistemas *in vitro*. Basados en la localización de estas secuencias que actúan en cis y por modelaje por

computadora se ha hipotetizado que los extremos de los RNAm interactúan por complementariedad, formando una estructura similar a un sartén, siendo el mango la secuencia consenso del extremo 3' terminal y de esta forma promover la síntesis de RNAd (Chen *et al.*, 1998).

Una molécula reportera fue integrada en forma artificial a uno de los segmentos de rotavirus y su expresión se analizó en células co-infectadas con un virus auxiliador (Gorziglia and Collins, 1992). Utilizando este sistema se identificaron nucleótidos actuando en cis en el extremo 3' terminal del genoma, necesarios para la expresión génica, pero la carencia de evidencia clara no permitió establecer si también son necesarias para la síntesis de las cadenas de polaridad negativa, y por lo tanto para la replicación del RNA. Sin embargo, en este sistema sí se detectó un aumento en la eficiencia de la traducción en las células infectadas por rotavirus, posiblemente debido a la presencia de un "enhancer" (favorecedor de la traducción) en el extremo 3' terminal sobre el gen expresando el reportero (Chizhikov and Patton, 2000).

III. I. II Encapsidación del RNA y ensamble del virión.

El mecanismo del empaquetado selectivo que conduce a la presencia de segmentos genómicos equimolares dentro de los rotavirus, o cualquier miembro de la familia *Reoviridae* aun es desconocido. Un modelo basado en la caracterización de intermediarios de replicación, aislados de células infectadas, propone la formación de un precursor de estos intermediarios de replicación, que consistiría en un RNAm viral, la RNA polimerasa VP1, la enzima adionadora de cap VP3 y la proteína de nucleación VP2. Un segundo modelo basado en la habilidad de auto-ensamble de varias proteínas de cápside de rotavirus (Labbé *et al.*, 1991; Crawford *et al.*, 1994), propone que es necesario que las pre-cápsides vacías se sinteticen para que el RNAm sea posteriormente insertado en estas. Un tercer modelo

esta basado en datos estructurales indicando que el núcleo (capa proteica interna) representa una colección de unidades pentaméricas separadas funcionalmente, cada unidad conteniendo su propia RNA polimerasa y enzima adicionadora de cap y siendo responsable de la transcripción de uno de los segmentos genómicos (Lawton *et al.*, 2000).

Una característica distintiva de la morfogénesis de rotavirus es que las partículas subvirales, las cuales se ensamblan en los viroplasma citoplasmáticos, geman a través de la membrana del Retículo Endoplásmico y las partículas maduras son envueltas transitoriamente. Este es uno de los aspectos más interesantes de la replicación de rotavirus, el cual los hace diferentes a otros miembros de la familia *Reoviridae*. La envoltura adquirida en este proceso, parece perderse una vez que las partículas se mueven al interior del Retículo, y el virión maduro que abandonan la célula no presenta envoltura.

Los sitios y detalles precisos de la replicación del RNA, aun son desconocidos. Sin embargo, los viroplasma, estructuras de fase densa son probablemente el sitio de síntesis de las partículas de doble capa que contienen RNA (Petrie *et al.*, 1983; Richardson *et al.*, 1986). Esta conclusión esta basada 1) en la localización de varias proteínas virales (VP2, NSP2, NSP5, NSP6) en los viroplasma y VP4 y VP6 en la periferia de los viroplasma y fuera del Retículo Endoplásmico (González *et al.*, 2000; Petrie *et al.*, 1984) y 2) sobre la observación de que partículas emergentes de estos viroplasma frecuentemente parecen gemar directamente al Retículo Endoplásmico que contiene NSP4 y VP7.

La maduración de rotavirus es un proceso dependiente de calcio, ya que la producción de virus disminuye, cuando se infectan células mantenidas en medio carente de calcio (Shahrabadi and Lee, 1986). En estas condiciones se observan casi exclusivamente partículas de doble capa, y no se observa la gemación al Retículo Endoplásmico (Shahrabadi *et al.*, 1987). Entre las

proteínas virales, VP7 se detectó en niveles reducidos, sugiriendo degradación en estas condiciones. Aunque el papel del calcio en la morfogénesis viral no está totalmente esclarecido, es probable que el calcio module el plegamiento de VP7 para su subsecuente ensamble en la partícula viral en formación. El ensamble apropiado de la capa externa en el Retículo también requiere la formación de puentes disulfuro sobre VP7 (Svensson *et al.*, 1994).

El entendimiento de la morfogénesis viral ha sido facilitada por la expresión de proteínas individuales o combinadas en células de insecto empleando baculovirus recombinantes (Crawford *et al.*, 1994; Labbé *et al.*, 1991; Redmond *et al.*, 1993; Zeng *et al.*, 1994). Estos ensayos demostraron que VP2 al ser expresada en forma individual, tenía la capacidad de autoensamblarse (ver figura 7). Al ser co-expresada con diferentes proteínas estructurales, se detectaron diferentes partículas semejantes a las virales, compuestas por, VP2, VP1/VP2, VP1/2/3, VP2/3, VP2/6, VP2/6/7, VP2/4/6/7 y VP1/2/3/6 (Crawford *et al.*, 1994; Zeng *et al.*, 1994). Estos resultados demuestran que las proteínas estructurales contienen la información intrínseca requerida para formar partículas semejantes a virus.

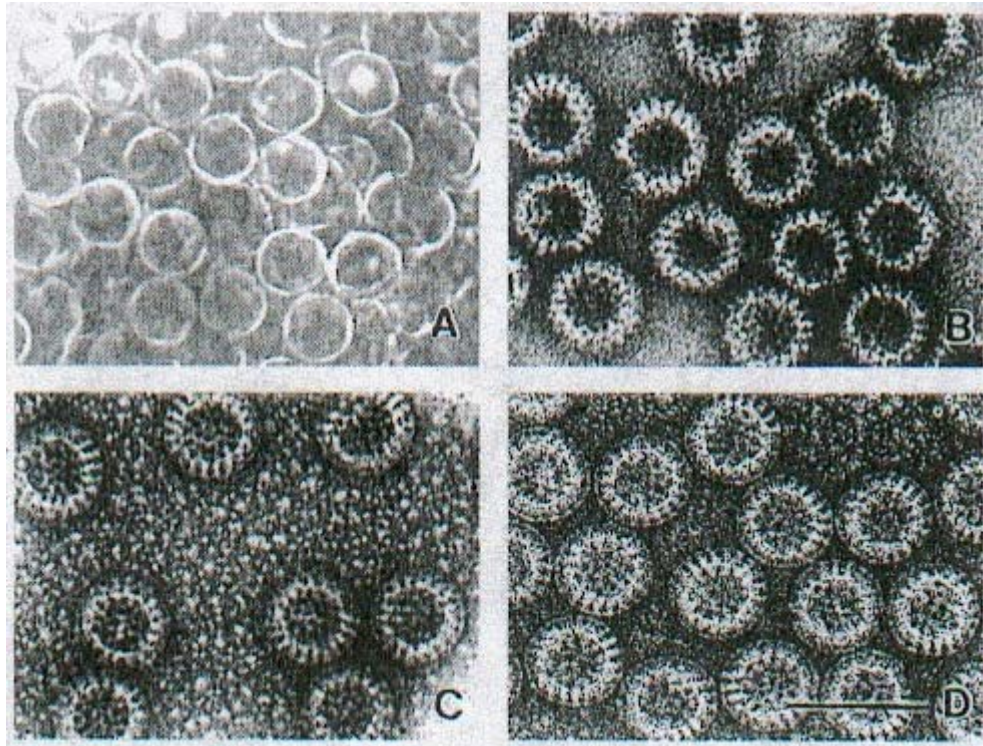


Figura 7. Partículas semejantes a rotavirus, obtenidas por el auto-ensamble de proteínas estructurales (o de cápside) al ser co-expresadas en células eucarióticas. A: VP2, B: DLPS-2/6, C: VLPS-2/6/7, D: VLPS-2/4/6/7. VLP es virus-like particle. Imagen tomada de Crawford *et al.*, 1994.

III. I. IV Liberación del virus maduro.

Estudios con microscopía electrónica han mostrado que el ciclo infeccioso de rotavirus culmina cuando la progenie viral es liberada mediante lisis celular en células no polarizadas (Altenburg *et al.*, 1980; Chasey, 1977; McNulty *et al.*, 1976). A pesar de la lisis celular, muchas partículas virales tanto de doble como de triple capa permanecen asociadas a la membrana celular, sugiriendo que estas partículas interactúan con estructuras celulares. Interacciones con la membrana celular y el citoesqueleto han sido sugeridas (Musalem and Espejo, 1985). Sin embargo, muchos detalles aun son desconocidos, como si miembros del citoesqueleto podrían funcionar como medio de transporte para proteínas y partículas virales.

Capítulo IV Viroplasmias de rotavirus.

El ensamble de los virus generalmente tiene lugar en compartimentos subcelulares específicos dentro de las células infectadas. Este suele ser un proceso que concentra componentes estructurales virales, y al genoma viral e incrementa la eficiencia del ensamble. El citoplasma es el sitio de ensamble para algunos virus con genoma de DNA, como poxvirus, iridovirus, etc.. Así mismo los componentes del citoesqueleto están frecuentemente asociados a la replicación y ensamble de ciertos virus, tal como el virus de parainfluenza humana tipo 3, que utiliza los filamentos de actina, para su replicación (Gupta *et al.*, 1998). La membrana externa de las mitocondrias son fundamentales para la replicación del virus flock house (Millar *et al.*, 2001). El virus vaccinia forma inclusiones citoplasmáticas, elementales para su replicación y maduración (Tolonen *et al.*, 2001) y el virus de herpes simple forma inclusiones nucleares requeridas para la replicación de su genoma (Roizman and Knipe, 2001).

Entre los miembros de la familia *Reoviridae*, la replicación y morfogénesis se lleva a cabo en inclusiones citoplasmáticas de fase densa, a las cuales se les ha denominado “fabricas virales” o “viroplasmias” (Rhim *et al.*, 1962; Altenburg *et al.*, 1980). Para el caso de rotavirus, estas inclusiones viroplasmicas se visualizaron por primera vez por Altenburg y colaboradores en 1980 utilizando técnicas de microscopía electrónica. Posteriormente estas estructuras se asociaron a la replicación y morfogénesis viral (Raming and Petrie, 1984). Mediante el empleo de anticuerpos específicos e inmunofluorescencia, se ha determinado que en los viroplasmias se encuentran dos proteínas no estructurales, NSP2 y NSP5 (figura 8), y las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3, y VP6 (Petrie *et al.*, 1984; Welch *et al.*, 1989). Sin embargo, el mecanismo de su formación es desconocido. Eichwald, y colaboradores sugirieron en el 2004 que el proceso de formación de los viroplasmias debe ser un proceso dinámico. Se determinó que el

número de los viroplasmos disminuyen conforme avanza el tiempo de la infección, pero el tamaño de los viroplasmos restantes incrementa, sugiriendo que los viroplasmos se fusionan conforme la infección transcurre (Eichwald *et al.*, 2004). Hasta la fecha se desconoce si los viroplasmos están asociados a algún elemento celular, como pudiera ser la membrana de un organelo o algún componente del citoesqueleto. De las seis proteínas virales que constituyen los viroplasmos, no hay evidencia que alguna de ellas se una a estos elementos. Otras proteínas virales como NSP4 y VP4 se unen a los microtúbulos. Específicamente la proteína NSP4 interfiere con el transporte intracelular de proteínas del Retículo Endoplásmico a Golgi (Xu *et al.*, 2000; Nejmeddine *et al.*, 2000). La participación de NSP4 en la formación de los viroplasmos es aun desconocida, sin embargo su ausencia produce viroplasmos pequeños, como fue visualizado al silenciar el gen de NSP4 con RNA interferente específico (López *et al.*, 2005).

En base a ensayos de inmunofluorescencia indirecta, se ha sugerido que NSP3 y NSP1 podrían estar asociadas a miembros del citoesqueleto, pero más bien con filamentos intermedios como vimentina (Mattion *et al.*, 1992; Hua and Patton, 1994). Sin embargo, ninguna de estas dos proteínas virales están contenidas en los viroplasmos ni han sido involucradas en su formación.

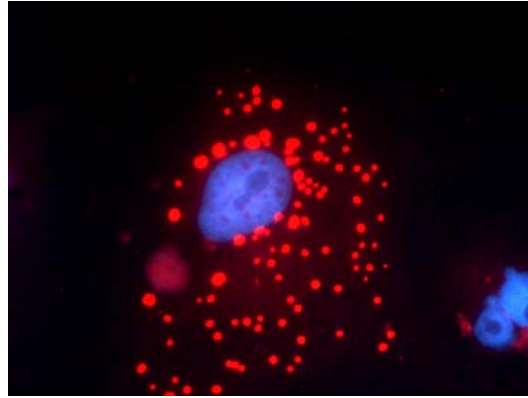


Figura 8. Viroplasmas (rojo) de rotavirus 18 horas post-infección en células BSC1. El núcleo fue teñido con DAPI.

Un indicio de que la interacción entre las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 es muy importante para el inicio de la formación de los viroplasmos, fue obtenida al co-expresarlas. Mediante ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos contra estas proteínas, se observó que ambas proteínas se condensan en estructuras similares a viroplasmos “VLS” (del inglés viroplasm like-structures), mientras que la expresión individual de cada una de ellas conduce a una distribución difusa en el citoplasma (Fabbretti, *et al.*, 1999). Y por medio de deleciones en NSP5, se ha demostrado que los primeros 30 aminoácidos son necesarios para interaccionar con NSP2 (Afrikanova, *et al.*, 1998). Estos datos sugieren que un primer paso para la formación de los viroplasmos, es la interacción entre las dos proteínas y una vez condensadas, de alguna manera formar los complejos. Sin embargo, es posible que la formación de los viroplasmos requiera de otras interacciones entre otras proteínas virales o de la asociación de algún elemento celular.

Tomando en cuenta que para la formación de los viroplasmos de reovirus, los microtúbulos tienen una función fundamental al dar soporte para la acumulación de proteínas residentes de los viroplasmos, no se puede descartar la posibilidad de que los microtubulos pudieran tener el mismo papel en la formación de viroplasmos de otros miembros de la familia *Reoviridae*. En el caso del virus de la lengua azul, BTV es sabido que los viroplasmos son detectados desde 4 horas post-infección, que su número y diámetro aumentan conforme transcurre el tiempo de la infección (Brookes *et al.*, 1993). Además existe un reporte donde estudios de microscopía de fluorescencia sugieren que la replicación de BTV esta asociada a filamentos intermedios, componentes del citoesqueleto (Eaton *et al.*, 1987).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al ser rotavirus el agente etiológico más importante de diarrea severa en niños menores de 5 años, causando medio millón de muertes anualmente en todo el mundo, resulta fundamental conocer en detalle las diferentes etapas de su ciclo replicativo.

Los viroplasmias son estructuras esféricas, electrodensas que se observan en células infectadas por rotavirus desde cuatro horas post-infección. Es en estas estructuras donde se lleva a cabo la replicación del genoma de rotavirus y parte del ensamble de nuevas partículas infecciosas. A pesar de que son conocidos los elementos virales que los componen, el mecanismo de formación de los viroplasmias es aun desconocido. NSP2 y NSP5 constituyen los componentes básicos de los viroplasmias, ya que al ser co-expresadas en células en la ausencia del resto de las proteínas virales, forman estructuras similares a los viroplasmias. Este dato sugiere que la interacción entre estas dos proteínas virales que conforman los viroplasmias podría ser fundamental para la formación de los viroplasmias en la etapa temprana de la infección. Sin embargo, dado que varios miembros de la familia *Reoviridae* (reovirus y virus de la lengua azul) basan su replicación y morfogénesis asociándose a componentes del citoesqueleto, tales como microtubulos y filamentos intermedios, consideramos importante estudiar la participación de elementos celulares en la formación de los viroplasmias de rotavirus.

En el presente trabajo se propone estudiar la capacidad que tenga la proteína NSP2 de interaccionar con otras proteínas virales localizadas en los viroplasmias como VP2, así como con proteínas celulares como la tubulina. Para analizar estas posibles interacciones se utilizará microscopía de fluorescencia y ensayos de co-inmunoprecipitación acoplados a Western blot de células infectadas con rotavirus. Aquellas interacciones que sean detectadas en células infectadas, se analizarán en células transfectadas que expresen en forma transitoria solo a las proteínas virales correspondientes, es decir sin la presencia del resto de las proteínas virales. También se tiene

contemplado el uso de drogas despolimerizantes de microtúbulos para analizar su posible participación en la formación de los viroplasmias de rotavirus. De esta forma se pretende contribuir al entendimiento del mecanismo por medio del cual se forman los viroplasmias, lo cual contribuirá a entender en forma detallada como el rotavirus lleva a cabo su replicación.

HIPÓTESIS

Si NSP2 tiene un papel fundamental en la formación de los viroplasma de rotavirus interactuará con otras proteínas virales localizadas normalmente en los viroplasma como VP2 y con proteínas celulares como tubulina tanto en células infectadas por rotavirus como en células transfectadas que expresen a las proteínas virales correspondientes.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar el papel de NSP2 en la formación de los viroplasmos de rotavirus, al interactuar con otras proteínas virales ó celulares.

Objetivos particulares:

- Producir un suero hiperínmune anti-NSP2 recombinante.
- Expresar a las proteínas NSP2, NSP5 y VP2 en células de mamífero por medio del sistema híbrido virus vaccinia-T7 y determinar su distribución intracelular por microscopía de fluorescencia.
- Evaluar si una red funcional de microtúbulos es necesaria para la formación de los viroplasmos de rotavirus.
- Determinar si NSP2 interactúa con tubulina en células infectadas por rotavirus, así como en células transfectadas que expresen a NSP2.
- Determinar si NSP2 interactúa con VP2 en la ausencia de cualquier otra proteína viral.

METODOLOGÍA

Material biológico:

- Células de Riñón de mono, MA104 y BSC-1.
- Rotavirus, cepa SA11.
- Virus Vaccinia vTF7-3.
- *Escherichia coli*, cepa; DH10B (Life Technologies).
- *Escherichia coli*, cepa; BL21-DE3 (Life Technologies).

Otros:

- Plásmido- vectores utilizados; pET28b (Novagen) y pVOTE1 (Moss *et al.*, 1996).
- Oligonucleótidos específicos para clonar los genes 2, 8 y 11 del rotavirus SA11:

Gen 2:

Oligo 5'; 5'-GTACATCCATGGCGTATCGAAAAC-3'

Oligo 3'; 5'-CATAGGATCCTTACAGTTCGTTTCATG-3'

Gen 8:

Oligo 5'; 5'-GTTATCCATGGCTGAGCTAGC-3'

Oligo 3'; 5'-GTTGGATCCTTAAATTCCTATTTGAGAA-3'

Gen 11:

Oligo 5'; 5'-GTATACCATGGCTCTCAGTATTGACGTG-3'

Oligo 3'; 5'-GTAGGATCCTTACAAATCTTCAATCAA-3'

Reactivos:

- Medio de cultivo LB, Broth Lennox (Novagen).
- Medio mínimo esencial de Eagle (Gibco; Life Technologies, Cat. No. 11700-069).
- Medio OptiMem (Gibco; Life Technologies, Cat. No.)
- Sistema ThermoScript para RT-PCR (Invitrogen. Cat. No. 11146-024).
- Elongasa, DNA polimerasa, (Invitrogen. Cat. No. 11304-011).
- Anticuerpos específicos; anti-NSP2 (Sergio Maldonado), anti-NSP5 (alícuota otorgada por el Dr. Carlos Arias), anti-VP2, anti-VP6, anti-rotavirus (producidos por el Dr. Luis Padilla).
- Anticuerpos comerciales; anti- α -tubulina (Santa Cruz Biotechnology), anti-actina (Chemicon), proteína A-peroxidasa (Kirkegaard and Perry Laboratories) y IgG de anti-conejo y IgG anti-ratón fusionados a peroxidasa (Pierce. Cat. No. 34095).
- Reactivos generales del laboratorio de biología molecular.

Soluciones:

- Laemli 10 X. Tris 0.25 M, glicina 1.92 M, SDS 1%.
- TAE 50X. Tris 2 M, EDTA 0.5 M pH 8, ácido acético 5.7 %.
- Acrilamida-Bis. Acrilamida 30 % y bis-acrilamida 0.8 %.
- Buffer de lisis EBC. Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 120 mM, NP40 0.5 %, Inhibidores de proteasas (sigma).
- Buffer NETN. Tris-HCl 20 mM, pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, NP40 0.5 %.
- Buffer de transferencia. Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1 %, metanol 20 %.
- SDS-PAGE al 12.5 % de 0.75 mm de espesor.
-

Equipo:

- Incubadora con atmósfera de CO₂ (Forma Scientific).
- Gabinete de seguridad biológica clase II A/B3 (Forma Scientific).
- Microscopio óptico invertido (Nikon).
- Microscopio de fluorescencia (Olympus).
- Termociclador (Perkin Elmer)
- Fuente de poder (E-C Apparatus Corporation; Thermo EC; Pharmacia Biotech).
- Agitador rotatorio (Stovall. Life Science).
- Potenciometro (Corning).
- Baño maría (Fisher Scientific).
- Sonicador vibra cell (Biocientífica).
- Cámara de transferencia semi húmeda (Hoefer, modelo TE 70).
- Revco de -70 °C (Forma Scientific).

La primera etapa de este trabajo consistió en expresar el gen 8 de rotavirus y la proteína NSP2 obtenida se purificó por cromatografía de afinidad con la intención de inmunizar cuyos para obtener un suero hiperínmune anti-NSP2 que nos permitiría estudiar su papel durante la formación de los viroplasmos de rotavirus.

Infección de células MA104 con rotavirus.

Con el objetivo de amplificar el rotavirus SA11 se infectaron células MA104. Se hizo crecer hasta a una monocapa confluyente de células MA104 en frascos F175 (1×10^5 células/cm²; 1.6×10^7 células totales) y se infectó con el virus SA11 C1.1.1 P1 (título 5×10^8 pfu/ml) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.75. El virus se activó con tripsina a una concentración final de 0.5 mg/ml, a 37 °C por 30 minutos. Las células fueron lavadas con medio MEM sin suero, se retiró el medio y se añadió el virus previamente activado. Se incubó a 37 °C y 5% de CO₂, hasta observar efecto citopático (redondeamiento de las células y refracción a la luz), generalmente observado entre 24 y 48 post infección.

Detección del rotavirus SA11 por electrofóresis de RNA.

Para confirmar la identidad del rotavirus SA11 se extrajo el RNAcid y se comparó con el RNAcid del rotavirus SA11 stock que sirvió de base para amplificar el virus. A 200 µl de células infectadas con rotavirus SA11 se añadieron 45 µl de buffer disruptor 4.55 X, se mezcló y se agregaron 200 µl de fenol saturado y 200 µl de cloroformo, se agitó en vortex por 2 minutos y se centrifugó a 12 000 g por 5 minutos. Se separó la fase acuosa en un tubo limpio y el resto se desechó. Se tomaron 90 µl de esta fase acuosa y se colocaron en un tubo limpio y se mezclaron con 10 µl de azul de bromofenol, se agitó en vortex y se analizó esta muestra (más un

control positivo) por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12 %. Para identificar el patrón electrofóretico de los 11 segmentos de rotavirus, se tiñó el gel con nitrato de plata.

Extracción y purificación del RNA de cadena doble de rotavirus.

Con el objetivo de obtener el genoma de rotavirus purificado, que servirá de base para amplificar los genes de interés (NSP2, NSP5), se extrajo y purificó el RNAcd del rotavirus SA11. Partiendo de 90 ml del virus SA11, se añadió 1/3 (30 ml) de Freón (Tricloro-trifluoretano, para eliminar el virus asociado a membrana) y se agitó vigorosamente en vortex. Se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 20 minutos en rotor JA14 Beckman. El sobrenadante se transfirió a tubos SW28 (~35 ml c/u) y se ultracentrifugó 60 minutos a 25 000 r.p.m. en rotor SW55 (primero se nivelaron los tubos con MEM sin suero). Se decantó el sobrenadante y el precipitado de cada tubo se resuspendió el precipitado de cada tubo en 200 μ l de agua milliQ estéril. Se tomó una alícuota de 100 μ l y el resto congelarlo a -70 °C.

A 100 μ l del virus purificado se añadieron 400 μ l de agua milliQ estéril y se mezcló suavemente. Se añadieron 25 μ l de SDS al 20 % y se mezcló suavemente sin generar burbujas. Se adicionaron 250 μ l de fenol y 250 μ l de cloroformo y se agitó un minuto en vortex moderado. Se centrifugó 3 minutos a 12 000 r.p.m., se colectó y medió la fase acuosa (600 μ l que se dividió en 2 Epperdorff de 1.5 ml). Se añadió 1/10 (30 μ l a cada tubo) del volumen de acetato de sodio 3 M pH = 5.2 y 2.5 volúmenes (750 μ l a cada tubo) de etanol absoluto y se mezcló suavemente invirtiendo el tubo. Se incubó 30 minutos a -20 °C. Se centrifugó a 14 000 r.p.m. por 15 minutos a 4 °C. Nota: como son dos tubos primero se centrifugó uno y luego se adicionó el otro al mismo tubo

para reunir todo el precipitado. Se añadió suavemente 750 μ l de etanol al 70 % frío al precipitado (para lavarlo) y se centrifugó a 14 000 r.p.m. por un minuto. Se decantó y se dejó secar a temperatura ambiente por 15 minutos. Se resuspendió el precipitado en 100 μ l de agua milliQ.

Purificación del RNACd por columnas RNA-easy (QIAGEN).

A 100 μ l de la fase acuosa, se añadieron 550 μ l del buffer RLT a la muestra y se mezcló con la pipeta. Se añadieron 250 μ l de etanol absoluto al lisado y se mezcló con la pipeta. La muestra se aplicó (700 μ l) a una mini-columna RNA-easy, colocada en un tubo de recolección de 2 ml y se centrifugó a 10 000 r.p.m. por 15 segundos. Se añadieron 500 μ l de buffer RPE y se centrifugó a 10 000 r.p.m. por 15 segundos para lavar. Se añadieron 500 μ l de buffer RPE para lavar la columna y se centrifugó dos minutos a 14 000 r.p.m. para secar la membrana. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de recolección de 1.5 ml y se añadieron 30 μ l de agua milliQ directamente sobre la membrana. Se centrifugó un minuto a 10 000 r.p.m. para fluir el RNA. Se analizó el RNACd purificado por electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 V por una hora en buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) y tinción con bromuro de etidio (1 μ g/ml).

Transcripción reversa (RT) del segmento 8 del rotavirus SA11.

Se amplificó el gen 8 de rotavirus por RT-PCR para expresarlo en bacteria y obtener antígeno viral suficiente para inmunizar cuyos y así obtener un suero hiperínmune anti-NSP2. La amplificación del gen 8 se inició con la síntesis de cDNA del segmento 8 a partir de RNACd genómico del rotavirus SA11. Se preparó una mezcla de transcripción reversa de 10 μ l totales a partir de \approx 500 ng de RNACd purificado del rotavirus SA11, 0.75 μ l de la mezcla de los cuatro di-nucleótidos trifosfato

(dNTPs) 10 mM, 0.5 μ l de cada uno de los oligonucleótidos correspondientes (10 μ M), 0.5 μ l (9 unidades, stock: 15 U/ μ l) de la transcriptasa reversa Thermo Script (Invitrogen) y 4 μ l de buffer de síntesis de cDNA 5 X (stock 5 X: Tris acetato 250 mM pH 8.4, acetato de potasio 375 mM, acetato de magnesio 40 mM, y estabilizador, Life Technologies). La mezcla se incubó a 48 °C durante 30 minutos.

PCR del gen 8 del rotavirus SA11.

La amplificación del cDNA del segmento 8 de rotavirus SA11 se realizó por PCR en un volumen final de reacción de 20 μ l que contenía, 15.5 μ l de agua milliQ, 0.4 μ l del cDNA (producto del RT-PCR), 0.4 μ l de dNTPs 10 mM (200 μ M final), 0.4 μ l de oligonucleótidos 10 μ M (20 nM final) y 0.2 μ l de la Platinum taq DNA polimerasa HF (Invitrogen), en 2 μ l de buffer de síntesis de PCR 10 X (Invitrogen) utilizando un programa de termociclador de 30 segundos a una temperatura de desnaturalización de 94 °C, 30 segundos a una temperatura de alineación de 50 °C, y 90 segundos a una temperatura de extensión de 68 °C durante 30 ciclos. Al final de la reacción se corrió un mini-gel de agarosa al 1 % en buffer TAE 1 X (Tris-base 2 M, EDTA 0.5 M, pH 8.0, ajustando con ácido acético glacial) a 100 V durante 1 hora en cámara Horizon 58 (Life Technologies) para determinar la presencia del gene amplificado y utilizando como control 500 ng (5 μ l) del marcador de peso molecular de DNA lineal de 1 Kb (Life Technologies, stock: 100 ng/ μ l).

Nota: Estos últimos pasos fueron los mismos para amplificar los genes 2 y 11.

Purificación del producto de PCR por columna Wizard (Promega).

Para poder digerir el producto de PCR con enzimas de restricción se purificó primero empleando columnas comerciales. La purificación del producto de PCR se llevó a cabo por la afinidad que tiene la resina de la columna Wizard para con el DNA, usando los reactivos proporcionados por el fabricante. Se colocaron 100 μ l del buffer de purificación directa en un tubo de microcentrífuga. Se agregaron 40 μ l del producto de purificación y se agitó en vórtex por 1 minuto. Se preparó una mini-columna (montándola en un tubo de recolección de 2 ml) y se depositó la mezcla de DNA/resina en ella. Con la ayuda de una jeringa se presionó suavemente la mezcla a través de la mini-columna. Se depositaron 2 ml de isopropanol (Burdick and Jackson, grado de pureza HPLC) al 80 % para lavar la columna. Se transfirió la columna a un tubo limpio de 1.5 ml para microcentrífuga. Se centrifugó la mini-columna por 2 minutos a 13 000 r.p.m. para secar la resina. Se transfirió la mini-columna a otro tubo de microcentrífuga y se agregaron 50 μ l de agua (purificada por el sistema milliQ, Millipore y estéril) a la mini-columna dejando reposar 1 minuto y se centrifugó por 20 segundos a 13 000 r.p.m para eluir los fragmentos de DNA unidos a la resina. Para comprobar la presencia de DNA purificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 V durante 1 hora en cámara Horizon 58 (Life Technologies). A partir del gel de agarosa se estimó el rendimiento como sigue: se cargaron 500 ng de marcador de peso molecular de DNA lineal de 1 Kb (stock: 100 ng/ μ l) en 5 μ l y la banda más intensa de este marcador representa el 10% (50 ng) por lo que se estimó visiblemente la intensidad de la banda control con la banda correspondiente al gene 8 de rotavirus RRV, y sobre esta base se estimó el rendimiento de la reacción de PCR. El DNA purificado se almacenó a -20 °C.

Clonación del gen 8 del rotavirus SA11 en el vector pET28b para su expresión en bacteria.

Digestión del gen 8 de SA11 y del plásmido vector pET 28b.

Se digirió 1 µg del inserto (DNA purificado) así como 1 µg del plásmido vector pET 28b con 1 unidad de las enzimas de restricción Nco I (10 U/µl) y Xho I (10 U/µl) (Life Technologies) en buffer 2 (composición final: Tris-HCl 50 mM pH 8, MgCl₂ 10 mM y NaCl 100 mM, Life Technologies). El tiempo de reacción fueron 2 horas a 37 °C en un volumen final de reacción de 20 µl. Se inactivó a las enzimas por 10 minutos a 65 °C. Se corrió un mini-gel de agarosa al 1 % a 100 V durante 1 hora para verificar la digestión, utilizando como controles 5 µl del marcador de DNA circular super-enrollado (stock: 100 ng/µl, Life Technologies), 2 µl del plásmido no cortado (stock: 400 ng/µl) y 5 µl del marcador de DNA lineal de 1 Kb (stock: 100 ng/µl). Y una vez comprobada la digestión, se purificó tanto el inserto como el plásmido por miniprep en columna Wizard.

Nota: Para expresar los genes 2 y 11 en células de mamífero, se clonaron de la misma manera en el vector pVOTE1, utilizando los sitios de restricción para Nco I y Bam H I.

Ligación de los productos de digestión.

Se introdujo el inserto del gen 8 de rotavirus SA11 (SA11-8) en el plásmido vector pET28b por la acción de la enzima ligasa del bacteriofago T4 utilizando una proporción molar inserto-plásmido de 3:1 durante la ligación. 65 ng del plásmido digerido pET 28b Nco I/Xho I fueron unidos con 35 ng del inserto (SA11-8), cortado con Nco I/Xho I en presencia de 5 unidades de la enzima ligasa T4 (Life Technologies, stock: 5 U/ μ l) en buffer de ligasa (concentración final: Tris-HCl 50 mM pH = 7.6, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 1 mM y polietilenglicol al 5 %) en un volumen final de reacción de 20 μ l. Se incubó a 16 °C durante \approx 12 horas.

Transformación de Escherichia coli DH10B por choque térmico.

Se introdujo el producto de ligación (pET 28b-SA11-8) a células de *E. coli* para evaluar la estabilidad de la construcción. Se descongelaron células competentes para choque térmico (según se indica más adelante) DH10B (Life Technologies, almacenadas a – 70 °C) sobre hielo. Las células competentes están preparadas para la introducción de DNA en forma eficiente. Se colocaron 50 μ l de las células DH10B (rubidio competentes) en un tubo frío y el equivalente a 10 ng de DNA producto de la reacción de ligación. Como controles se utilizó al plásmido vector cortado con Nco I/Xho I, el plásmido circular y bacterias sin plásmido. Se incubaron las reacciones en hielo por 30 minutos y se sometió las células a un pulso de choque térmico a 42 °C por 20 segundos (la duración del pulso es crítico para la eficiencia de la transformación). Se incubaron las reacciones en hielo por 2 minutos y se añadieron 0.9 ml de medio SOC a 42 °C para cada reacción de transformación y se incubaron a 37 °C por 1 hora con 225 r.p.m. de agitación. Se platearon 100 μ l de cada muestra en diferentes concentraciones (entre 10⁰ y 10⁻²) en una placa de LB con el

antibiótico apropiado y se determinó la eficiencia de transformación. Posteriormente se realizaron minipreps para corroborar la presencia de la construcción en las bacterias.

Miniprep por lisis alcalina de las transformantes.

Con el objetivo de corroborar que las bacterias que crecieron en medio selectivo (LB más kanamicina 100 $\mu\text{g/ml}$) contuvieran el plásmido recombinante, se extrajo el DNA plasmídico por lisis alcalina y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se inocularon 5 ml de medio LB líquido sin antibiótico con una colonia bacteriana aislada. Se hicieron crecer a saturación a 37 °C y 225 r.p.m. Se centrifugó a máxima velocidad por 20 segundos (repetiendo este paso hasta reunir la pastilla de los 5 ml en el mismo tubo de 1.5 ml). Se retiró el sobrenadante y resuspendió la pastilla bacteriana en 100 μl de GTE (Tris 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM y glucosa 50 mM) más RNasa A (concentración final de 500 ng/ml). Se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente y se adicionaron 200 μl de una solución de NaOH 0.2 N/SDS 1%, mezclando por inversión del tubo con la mano, dejando reposar 5 minutos en hielo. Se adicionaron 150 μl de solución acetato de potasio 5 M pH = 4.8 y se aplicó rápidamente vórtex para mezclar, dejando reposar en hielo por 5 minutos. Se centrifugó 3 minutos a máxima velocidad para eliminar desecho celular y DNA cromosomal. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se mezcló con 0.8 ml de etanol al 95 %, dejando reposar 2 minutos a temperatura ambiente para precipitar el DNA plasmídico. Se centrifugó por 1 minuto a máxima velocidad (14 000 r.p.m.). Se desechó el sobrenadante, y lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70 %, dejando secar a temperatura ambiente para eliminar todo el etanol. Se resuspendió la pastilla (DNA plasmídico) en 30 μl de agua destilada y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g/ml}$) para comprobar la presencia de la construcción.

Transformación en Escherichia coli BL21-DE3 por choque térmico.

Una vez que se amplificó el plásmido recombinante, se introdujo a bacterias de expresión *E. coli* BL21 para sobre-expresar el gen 8 de rotavirus. Se descongelaron células BL21-DE3 competentes sobre hielo y se colocaron 100 μ l de estas células en un tubo de polipropileno de 5 ml (un tubo para cada muestra) y se añadieron 20 ng de DNA de cada reacción de transformación, mezclando abundantemente. Como controles se utilizaron el pET 28b solo sin inserto y células solas y como control de la transformación se añadió 1 μ l del plásmido control pUC18 a una alícuota de 100 μ l de células competentes. Se incubaron las reacciones en hielo por 30 minutos y se sometió las células a un pulso de choque térmico a 42 °C por 20 segundos (la duración del pulso es crítico para la eficiencia de la transformación). Se incubaron las reacciones en hielo por 2 minutos y se añadieron 0.9 ml de medio SOC a 42 °C para cada reacción de transformación y se incubaron a 37 °C por 1 hora con 225 r.p.m. de agitación. Se platearon 100 μ l de cada muestra en diferentes concentraciones (entre 10^0 y 10^{-2}) en una placa de LB con el antibiótico apropiado y se determinó la eficiencia de transformación. Posteriormente se realizaron nuevamente minipreps para corroborar la presencia de la construcción en las células, siguiendo el mismo protocolo de lisis alcalina.

Inducción de la expresión de la proteína recombinante NSP2.

La inducción de la expresión de la proteína recombinante NSP2 se realizó empleando IPTG 1mM y se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 %. Se prepararon precultivos inoculando con una asada de colonia bacteriana a c/u de los tubos con 5 ml de medio LB líquido con kanamicina se incubaron a 37 °C y 225 r.p.m. durante 10 horas. Se utilizaron como muestras; A) BL21-DE3, B) pET 28b/BL21-DE3 y C) pET 28-SA11-8/BL21-DE3. Se inoculó con 0.25 ml del precultivo un matraz con 25 ml de medio LB + Kan (para las muestras B y C) y medio LB solo (para la muestra

A). Se incubó a 37 °C y 225 r.p.m. de agitación hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600}) entre 0.3 y 0.45. Se inocularon dos matraces para cada muestra etiquetados como inducidos y no inducidos, añadiendo al primero IPTG a una concentración final de 1 mM e incubando por 2.5 horas adicionales a 37 °C con 225 r.p.m. de agitación. Se centrifugó a 6430 r.p.m. en rotor JA20 por 5 minutos a 4 °C, desechando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla en 0.25 del volumen de LB, utilizando Tris-HCl 20 mM pH 8.0 frío. Se centrifugó a 6430 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante y almacenó la pastilla a -20 °C.

Purificación de NSP2 solubilizada con urea 8 M en columna Ni-NTA.

La proteína recombinante NSP2 sobre-expresada en bacteria se purificó por cromatografía de afinidad con el objetivo de tener un antígeno viral puro para inmunizar cuyos y obtener un suero hiperínfune anti-NSP2. Se resuspendieron las pastillas de bacterias inducidas [BL21-DE3-pET28-SA11-8, BL21 DE3-pET28 y BL21-DE3] en 1 ml de buffer de sonicación (PBS A 1X, y los inhibidores de proteasas; aprotinina 0.1% v/v, leupeptina 0.046% v/v y PMSF 0.5% v/v), se desechó la mitad y se sonicó la otra, a una amplitud de 60, durante 30 segundos por 10 ciclos o hasta observar que el lisado se clarificara, dejando un minuto de reposo entre cada ciclo de sonicación. Se centrifugó a 11,000 r.p.m. por 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a tubos limpios y se resuspendieron las pastillas de centrifugación en 1 ml de buffer B [urea 8 M, NaH_2PO_4 0.1 M, Tris-HCl 0.01 M, pH 8.0, más los inhibidores de proteasas PMSF 0.2% v/v, aprotinina 0.1% v/v, leupeptina 0.046% v/v y cocktail de inhibidores de proteasas (libre de EDTA, Nro de catálogo 1836170, Roche) al 1% v/v], y se incubó a temperatura ambiente con agitación (en vortex, velocidad 2) por 12 horas retirando en este paso una alícuota de 50 μ l. Las muestras se centrifugaron por 20 minutos a 11,000 r.p.m. a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a tubos limpios, retirando en este paso una alícuota de 50 μ l. La pastilla de centrifugación se resuspendió en 50 μ l de buffer salino de fosfatos (PBS) y se tomó una

alícuota de 10 μ l. La mini-columna de Ni-NTA se equilibró con 600 μ l de buffer B y se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se añadió el sobrenadante de las muestras tratadas con el buffer B a la mini-columna y se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 2 minutos, tomando una alícuota de 50 μ l. La mini-columna se lavó 3 veces con 600 μ l del buffer C (urea 8 M, NaH_2PO_4 0.1 M, Tris-HCl 0.01 M, pH 6.3) y se centrifugó a 2000 r.p.m. por 2 minutos, tomando una alícuota de 50 μ l de cada lavado. La proteína se eluyó 2 veces con 100 μ l de buffer E (urea 8 M, NaH_2PO_4 0.1 M, Tris-HCl 0.01 M, pH 4.5), se centrifugó a 3000 r.p.m. por 2 minutos y se colectó en un tubo estéril, tomando una alícuota de 100 μ l. Los productos de purificación se analizaron (pastillas, sobrenadante, flujo, lavados y eluato) por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS) en buffer Laemli a 200 Volts por 4.5 horas.

Obtención de un suero hiperínmune específico anti-NSP2.

Con el objetivo obtener un suero hiperínmune anti-NSP2 se inmunizaron cuyos con la proteína recombinante NSP2 purificada. Se inmunizó con una emulsión formada con 100 μ g de la proteína NSP2 purificada más 400 μ l de adyuvante de Freund's un conejo durante 2 meses, inyectándosele 4 dosis en total. Al final de este periodo, se extrajo sangre al animal y se separó el suero dejando formar el coagulo y eliminándolo con cuidado. El resto de células fue extraído por centrifugación. Finalmente se analizó tanto la especificidad y calidad de dicho suero por microscopía de inmunofluorecencia y Western blot.

Una vez que se contó con un suero hiperímmune anti-NSP2, se procedió a estudiar el papel de NSP2 en la formación de los viroplasmias de rotavirus. Para lograr esto se inició con la expresión de NSP2 (además de NSP5 y VP2) en células de mamífero empleando el sistema del virus vaccinia-T7.

Expresión de NSP2, NSP5 y VP2 en células de Riñón de mono BSC1.

Para analizar la posible participación de las proteínas NSP2, NSP5, y VP2 en la formación de los viroplasmias, se expresaron en células de mamífero mediante el sistema del virus vaccinia-T7. Partiendo de células BSC1 en confluencia en una caja de 6 pozos, se infectó a una MOI de 3 con el virus vaccinia vTF7-3 (Fuerst, *et al.*, 1986) previamente activado con tripsina (concentración final de 0.125 mg/ml) a 37 °C por 30 minutos. El medio se retiró de las células, se agregaron 500 µl del virus activado a cada pozo y se incubó por 1 hora a 37 °C con 5 % de CO₂. Al mismo tiempo se preparó la mezcla de transfección en tubos de polipropileno y consiste en añadir 8 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogene) a 250 µl de medio OptiMem sin suero (Invitrogene) y el equivalente a 60 ng de plásmido recombinante correspondiente en el mismo volumen de medio. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y al término de este tiempo se mezclaron ambos tubos y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Al terminar el tiempo de incubación de las células con el virus, este se retiró y se agregó la mezcla de transfección a las células y se incubó por una hora a 37 °C con 5 % de CO₂. Al término de la incubación, se retiró la mezcla de transfección y se adicionó OptiMem suplementado con 10 % de suero fetal de bovino y se incubó por 16 hrs. a 37 °C con 5 % de CO₂. Las células fueron desprendidas con la ayuda de un gendarme y colectadas en tubos Eppendorf de 0.6 ml bien etiquetados.

Western blot para detectar la expresión de NSP2, NSP y VP2.

Con la intención de demostrar la identidad de las proteínas virales expresadas en células de mamífero, se empleo la técnica de Western blot y anticuerpos específicos para cada una de las proteínas expresadas. Se lisaron $\approx 250\ 000$ de células BSC1 que expresan las proteínas virales VP2, NSP2 y NSP5, y células sin plásmido como control negativo, por sonicación en copa con hielo por 3 ciclos de 20 segundos a 60 de amplitud. Los lisados fueron analizados por electroforesis en buffer Laemli (Tris-HCl 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 0.1 %) en un gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes. Una vez separadas las proteínas totales fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 20 % de metanol y SDS 0.1 %). La membrana fue previamente equilibrada 10 minutos en agua y 10 minutos en buffer de transferencia. Las condiciones de la transferencia fueron 180 mA constantes durante 1 hora en una cámara semi-húmeda. Al termino de la transferencia la membrana fue bloqueada con leche al 5 % en PBS 1 X-tween 0.1% por una hora a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente la membrana se lavó tres veces con PBS 1 X-tween 0.1% por 5 minutos con agitación y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente a una dilución 1:1000 para NSP2 y NSP5 y 1:500 para VP2 en 3 ml de solución bloqueadora. Se incubo toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se lavó tres veces con PBS 1 X-tween 0.1% por 5 minutos con agitación y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-raton, anti-conejo ó proteína A fusionados a peroxidasa) a una dilución de 1:1000 por 40 minutos a temperatura ambiente con agitación. Nuevamente la membrana se lavó tres veces con PBS 1 X-tween 0.1% por 5 minutos con agitación y se realizó un ultimo lavado con agua. La detección de las proteínas virales se observo al añadir el substrato para la peroxidasa. Al degradarlo emite luz en la zona de la membrana donde esta ubicada la proteína con la que el anticuerpo reacciona y mediante la ayuda del

marcador de peso molecular pre-teñido fue identificada la proteína viral de interés.

Distribución intracelular de VP2, NSP2 y NSP5 por microscopía de inmunofluorescencia.

Para determinar la distribución intracelular de las proteínas NSP2, NSP5 y VP2 expresadas en células se mamífero se sembraron 4×10^4 células BSC1 en 200 μ l de medio MEM-10 en una placa de 24 pozos y se incubo a 37 °C con 5% de CO₂ hasta alcanzar una monocapa confluyente. Se infectaron con el virus vaccinia vTF7-3 con una MOI de 0.1. El virus se activo previamente con tripsina (0.125 mg/ml concentración final) en medio MEM sin suero por 30 minutos a 37 °C y posterior sonicación en copa con hielo de tres ciclos de 20 segundos cada uno a 60 de amplitud. Se infecto con 40 μ l del virus activado a cada pozo y se incubo por 1 hora a 37 °C con 5 % de CO₂. Media hora antes de terminar la infección, se preparo la mezcla de transfección. En tubos de poliestireno se coloco 50 μ l de medio Optimem (Invitrogene) sin suero y se les añadió 4 μ l de lipofectamina 2000 (Invitrogen). En otros tubos se agrego también 50 μ l de medio y el equivalente a 60 ng del plásmido correspondiente. Se incubo por 5 minutos a temperatura ambiente y se mezclaron la lipofectamina con el plásmido, incubándose por 20 minutos más a temperatura ambiente. Al culminar la hora de infección, se retiro el virus y se añadió la mezcla de transfección y se incubo por 1 hora a 37 °C con 5% de CO₂. Se retiro el medio de transfección y se añadió 200 μ l de medio Optimem suplementado con 10 % de suero fetal de bovino y se incubo a 37 °C con 5% de CO₂ por 18 hrs.. Para iniciar la tinción, la placa se colocó sobre hielo por 5 minutos. Se elimino el medio de transfección y se lavo tres veces con 200 μ l PBS 1 X frío. Las células fueron fijadas con 200 μ l de paraformaldehído (PFA) al 2%; triton X-100 al 0.1 % por 30 minutos sobre hielo. Se elimino el fijador y se lavo nuevamente tres veces con 200 μ l PBS 1 X frío. Al mismo tiempo se diluyeron los anticuerpos primarios en PBS 1 X, el suero anti-NSP2 se diluyo

1:200, el suero anti-NSP5 1:400 y el monoclonal anti-VP2 1:200. Los anticuerpos diluidos fueron centrifugados por 2 minutos a máxima velocidad. Se añadieron 60 μ l del anticuerpo correspondiente en cada pozo y se incubó por 1 hora sobre hielo. Se eliminó el anticuerpo y se lavó tres veces con 200 μ l PBS 1 X frío al mismo tiempo que se diluye el anticuerpo secundario en PBS 1 X, tanto el anti-ratón fusionado a FITC, anti-cuyo fusionado a FITC, anti-conejo fusionado a rojo Texas, fueron diluidos 1:100 y centrifugados 2 minutos a máxima velocidad antes de utilizarse. 60 μ l fueron añadidos de cada anticuerpo secundario correspondiente a cada pozo y se incubó durante 1 hora a 4 °C. Nuevamente se lavó tres veces con 200 μ l PBS 1 X frío y se dejó secar muy bien los pozos y se añadió unas gotas de medio de montaje DAKO y se cubrió con un cubre-objetos de vidrio y se selló con barniz de uñas. Se dejó reposar la laminilla cubriéndola con papel aluminio para protegerla de la luz y se observó al microscopio de inmunofluorescencia para determinar la ubicación intracelular de las proteínas virales.

Co-inmunoprecipitación de NSP2 y tubulina.

Para analizar si NSP2, la proteína más abundante de los viroplasmos de rotavirus, se une a los microtúbulos, NSP2 se coimmunoprecipitó con anticuerpos anti-tubulina. Se resuspendieron con 200 μ l de buffer de lisis EBC (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 120 mM, NP40 0.5 % e inhibidores de proteasas para células de mamífero-Sigma) precipitados de $\approx 5 \times 10^5$ células que expresan a NSP2 y como control negativo células transfectadas con el vector vacío. En algunos casos se partió de precipitados con la misma cantidad de células pero infectadas con rotavirus. Se centrifugaron las muestras a 14 000 r.p.m. durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante de cada muestra es recuperado en tubos Eppendorf de 1.5 ml limpios y se incubaron con 3 μ l de anticuerpo monoclonal anti-tubulina (Santa Cruz) y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Al término de la incubación, se adicionó 50 μ l de proteína A unida a perlas de sefarosa y nuevamente se incubó a 4 °C por 1 hora más. Se centrifugaron las muestras por 2 minutos a 14 000 r.p.m.

a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Se adicionaron 500 µl de buffer NENT (COMPOSICION) para lavar las perlas de sefarosa, se mezcló inclinando un par de veces el tubo Eppendorf y se centrifugó 2 minutos a 14 000 r.p.m. a 4 °C. Nuevamente se desechó con cuidado el sobrenadante y se repitió el lavado. Un último lavado se dio a las perlas de sefarosa se dio con PBS 1 X y se centrifugó por 2 minutos a 14 000 r.p.m. a 4 °C y se retiró con cuidado el sobrenadante. Finalmente se añadió 40 µl de buffer de muestra y se hirvieron las muestras por 3 minutos en baño María. Las muestras se analizaron en un gel desnaturante (SDS) de poliacrilamida al 12% en buffer Laemmli (Tris 0.25 mM, glicina 1.92 mM, SDS 0.1%), utilizando las siguientes condiciones de corrida; 50 Volts en forma constante durante aproximadamente 15 horas. Al finalizar se procedió a la detección de NSP2 por Western blot como ha sido descrito anteriormente.

RESULTADOS

En este trabajo fundamentalmente abordamos el papel de la proteína NSP2 en la formación de los viroplasmata de rotavirus, principalmente al interactuar con otras proteínas virales como NSP5 o bien con proteínas celulares como tubulina. Sin embargo, un problema metodológico constituía la ausencia de un buen anticuerpo anti-NSP2, por lo tanto comenzamos por clonar el gen 8 del rotavirus SA11 para expresarlo en bacteria y purificar la proteína NSP2 recombinante mediante cromatografía de afinidad. Una vez contando con la proteína NSP2 purificada, se inmunizaron cuyos para obtener un suero hiperinmune anti-NSP2. La especificidad del suero anti-NSP2 se analizó por microscopía de fluorescencia y Western blot en células infectadas o sin infectar por rotavirus. Ya contando con el suero específico anti-NSP2 y empleando anticuerpos comerciales anti-tubulina, se abordó el estudio de la participación de la proteína NSP2 y de los microtúbulos en la formación de los viroplasmata de rotavirus mediante microscopía de fluorescencia y ensayos de co-inmunoprecipitación a partir de células infectadas con rotavirus o bien células que expresaban transitoriamente a NSP2 y/o NSP5. En forma simultánea se analizó la posible interacción entre las proteínas NSP2 y VP2 empleando la misma metodología.

Amplificación del gen 8 del rotavirus SA11 por RT-PCR.

Con el objetivo de confirmar la identidad del rotavirus SA11 que sirvió de base para amplificar los genes de interés, se infectaron células MA104 con el rotavirus SA11, se extrajo el RNAcd y se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% y tinción con plata (figura 9, carril 1). Como se puede apreciar en la figura 10 el patrón electrofóretico del rotavirus SA11 (muestra) coincide perfectamente con el patrón electrofóretico del stock del laboratorio, virus que se utilizó para infectar células y obtener el virus SA11 problema, indicando que el RNAcd de ambos virus migran igual y que no se presenta ningún gen rearrreglante.

Una vez confirmada la identidad del virus SA11, se purificó el RNAcd genómico del rotavirus SA11, a partir de virus concentrado por ultracentrifugación, obtenido de células MA104 infectadas con el rotavirus SA11. El RNAcd se analizó por electroforesis en gel de agarosa, el cual no permite la separación de los 11 segmentos, sino únicamente de los cuatro grupos de genes, el grupo I consta de los genes 1-4, el grupo II de los genes 5-6, el grupo III 7-9, y el grupo IV 10-11 (figura 10, carril 2). El patrón de bandas observado es el característico de los cuatro grupos de genes de rotavirus, con lo que nos confirma que efectivamente se trata de los ácidos nucleicos que constituyen al genoma de rotavirus.

A partir del RNAcd purificado se amplificó el gen 8 del rotavirus SA11 por transcripción reversa y PCR. Los oligonucleótidos específicos nos permitieron añadir los sitios de restricción NcoI y BamHI. La adición de una “cola” de histidinas (para facilitar su purificación al ser expresada en bacteria nos obligó a adicionar dos aminoácidos (leucina y ácido glutámico) entre el extremo carboxilo de NSP2 y la “cola” de histidinas.

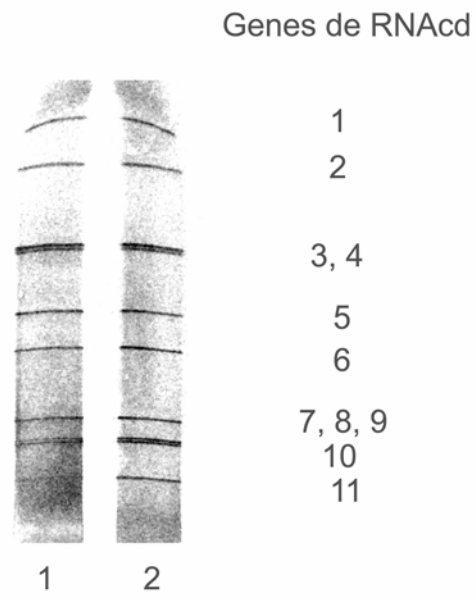


Figura 9. Identificación del rotavirus SA11. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% y tinción con plata del RNAcd extraído de células infectadas con el rotavirus SA11. 1) RNAcd de SA11 y 2) stock control del laboratorio.

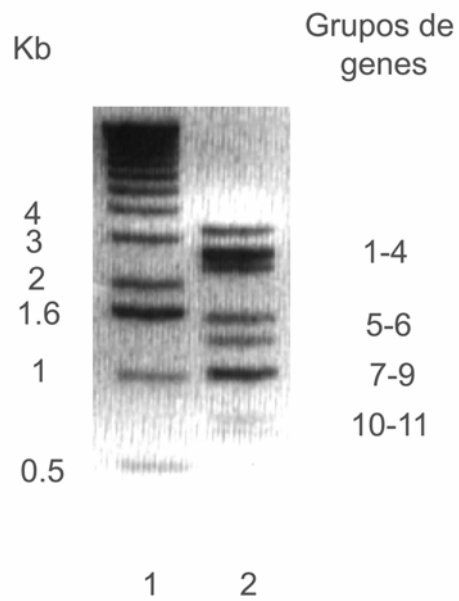


Figura 10. Obtención de RNACd del rotavirus SA11. Electroforesis en mini-gel de agarosa de RNACd purificado por columna y teñido con bromuro de etidio. 1) Marcador de peso molecular de DNA lineal de 1 kb, y 2) A la derecha se señalan los RNACd de SA11 purificados.

Como resultado se obtuvo la amplificación de una secuencia del tamaño esperado (951 pb) como se puede apreciar en la figura 11. Una vez amplificado el gen correspondiente a NSP2 se clonará para su expresión en bacteria con el objetivo de obtener un suero hiperinmune anti-NSP2.

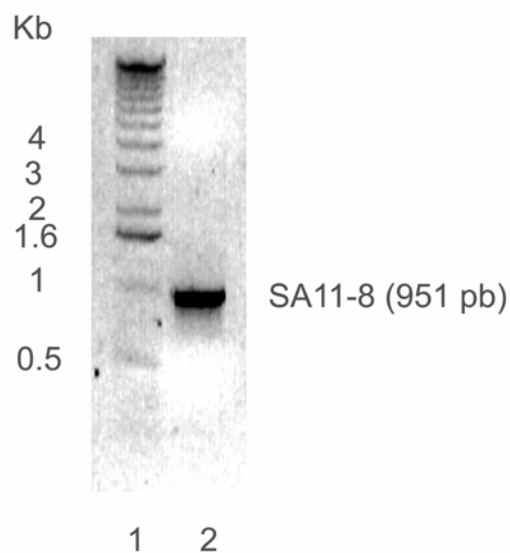


Figura 11. Amplificación del segmento 8 del rotavirus SA11. Electroforesis en mini-gel de agarosa del gen 8 amplificado por RT-PCR y teñido con bromuro de etidio. 1) Marcador de peso molecular de DNA lineal de 1 kb y 2) DNACd del gen 8 del rotavirus SA11 (951 pb) amplificado por RT-PCR.

Clonación del gen 8 del rotavirus SA11 en el plásmido vector pET28b.

Una vez amplificado y purificado por columna, el gen 8 de SA11 se clonó en el plásmido vector pET28b como se indica en la metodología.

Se obtuvo una eficiencia de transformación de 4×10^4 ufc/ μ g al transformar las bacterias DH10B por electroporación con el plásmido recombinante pET28b-SA11-8. Ocho de 12 clonas analizadas tuvieron el peso molecular esperado (6319 pb, dado que el plásmido vector tiene un peso molecular de 5368 pb y el inserto 951 pb) y las otras cuatro tuvieron el peso molecular del vector sin inserto. Para los experimentos posteriores se trabajó con la clona 1. A partir de dicha clona se amplificó y purificó el plásmido recombinante (figura 12, carril 3).

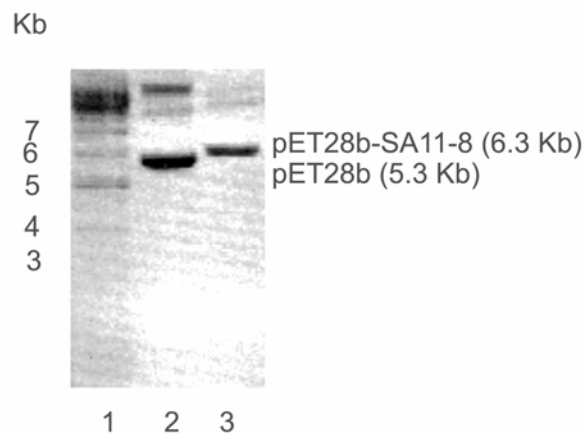


Figura 12.- Propagación del plásmido recombinante pET28-SA11-8 (clona 1). Electroforesis en mini-gel de agarosa del pET28-SA11-8 clona 1, teñido con bromuro de eitdio. 1) Marcador de peso molecular de DNA superenrollado, 2) pET28b (5368 pb) y 3) pET-28-SA11-8 (6319 pb).

Una vez amplificado el plásmido recombinante pET28-SA11-8, se usó para transformar bacterias de expresión *E.coli* BL21-DE3.

De las 9 colonias analizadas de las bacterias de expresión transformadas con el plásmido que expresa a NSP2, todas poseían el tamaño molecular esperado (6.3 Kb), excepto la número 9, que presentó el tamaño molecular correspondiente al plásmido vector vacío (5.3 kb) y se denominaron clona 1.1, 1.2, 1.3, etc., ya que todas provienen de la misma clona original. Excepto la clona analizada en el carril 10 en la cual se encontró un tamaño molecular correspondiente al vector vacío, indicando que no poseía el gen de NSP2. Con el plásmido vector sin inserto, sólo se analizó una colonia, encontrándose el plásmido vector en el tamaño esperado (5.3 Kb; figura 13, carril 11). Es importante mencionar que en cada plásmido muestra otras bandas adicionales en la parte superior del gel y que corresponden a las formas enrolladas de los plásmidos que migran más lentamente.

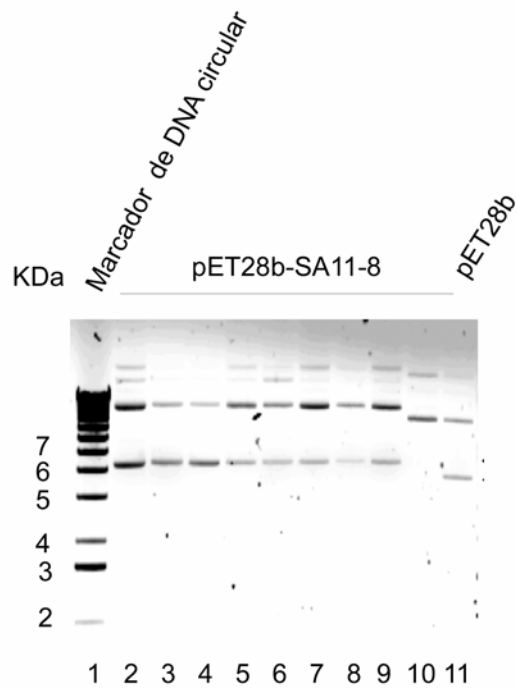


Figura 13. Transformación de bacterias de expresión BL21-DE3 con pET28-SA11-8. Electroforesis en minigel de agarosa de minipreps de 9 diferentes colonias de bacterias analizadas y teñido con bromuro de etidio. 1) Marcador de peso molecular de DNA superenrollado, del carril 2 al 10 son diferentes clonas del plásmido recombinante BL21-(DE3)-pET28-SA11-8 clona 1.1-1.9 y 11) BL21-(DE3)-pET28b.

Expresión y purificación de la proteína NSP2.

Con el objetivo de inducir la expresión de la proteína NSP2 recombinante, se adicionó IPTG (1mM concentración final), y al final el periodo de 2 horas de inducción, se lisaron las bacterias y se sometió a electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS) en gel de poliacrilamida al 12%, teñido con azul de Coomassie. Los lisados bacterianos totales (sonicadas), como las proteínas insolubles (precipitados), se observan en los carriles 1-5 y 6-9 respectivamente (figura 14). La proteína recombinante NSP2 fue ubicada en el peso molecular esperado (34 kDa), la cual se indica inducida con un triángulo en el gel de la figura 14. Así mismo, se detectó también una proteína de menor tamaño (\cong 18 kDa) en las muestras de bacterias con el plásmido recombinante y que fueron inducidas. Esta segunda proteína podría ser un producto de degradación de la proteína NSP2 recombinante.

La mayor parte de la proteína NSP2 presente en los lisados se detectó en la fracción de los precipitados, sugiriendo que la proteína NSP2 recombinante se localizaba predominantemente insoluble (figura 14, carril 4 y 8).

Para analizar si podríamos incrementar la síntesis de la proteína NSP2 recombinante, se exploraron diferentes tiempos de inducción y evaluando la producción de NSP2 por electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con Coomassie (figura 15). Como puede apreciarse en la figura 16, hay un aumento del 50% en la síntesis de la proteína NSP2 si el periodo de inducción es de 4 hrs. en vez de 2.5 (figura 15, carriles 4 y 5). Sin embargo no aumenta en gran medida si el periodo de incubación se prolonga hasta 18 hrs. (figura 15, carril 6). Por lo tanto se utilizaron 4 hrs. como periodo optimo de inducción para la síntesis de NSP2 recombinante. Nuevamente cabe señalar que se detectó la proteína de 18 kDa en todos los carriles inducidos y al igual que en el caso de la proteína NSP2 se detectó un aumento cuando el periodo de incubación fue de 4 hrs. en lugar de 2.5 hrs. (figura 15, carriles

4 y 5). Esto sugiere que efectivamente podría tratarse de un producto de degradación de la proteína NSP2.

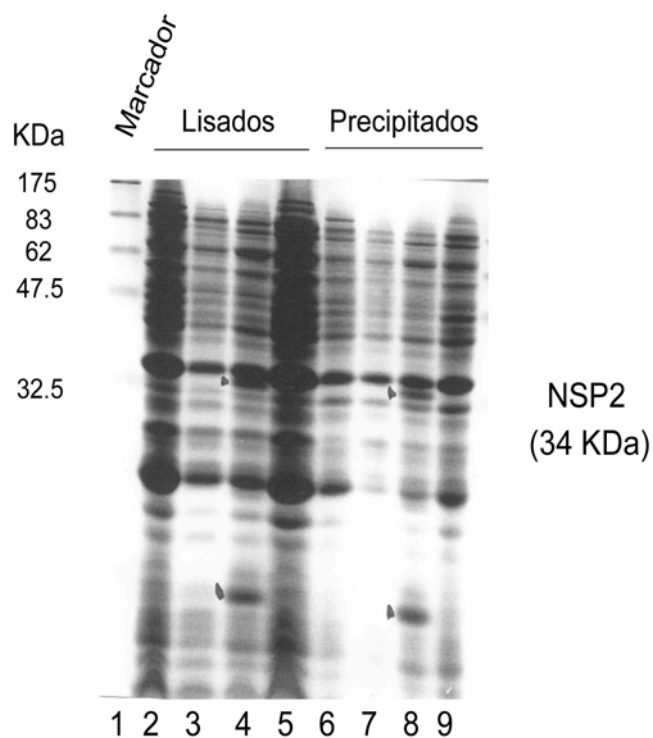


Figura 14. Análisis de proteínas totales y fracción de precipitados para detectar la expresión de la proteína recombinante NSP2 a través de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS) y tinción con azul de Coomassie. 1) Marcador de peso molecular, 2) lisado de BL21-DE3, 3) lisado de BL21-DE3-pET28b, 4) Lisado de BL21-DE3-pET28b-SA11-8 clona 1.1 inducido, 5) lisado de BL21-DE3-pET28b-SA11-8 clona 1.1 no inducido, 6) precipitado BL21-DE3-, 7) precipitado BL21-DE3-pET28, 8) precipitado BL21-DE3-pET28-SA11-8-clona 1.1 inducido y 9) precipitado BL21-DE3-pET28-SA11-8 clona 1.1 no inducido. A la derecha del gel se indica la posición esperada de la proteína recombinante

NSP2. El triángulo negro señala la ubicación de NSP2 y en la parte inferior del gel, un posible producto de degradación.

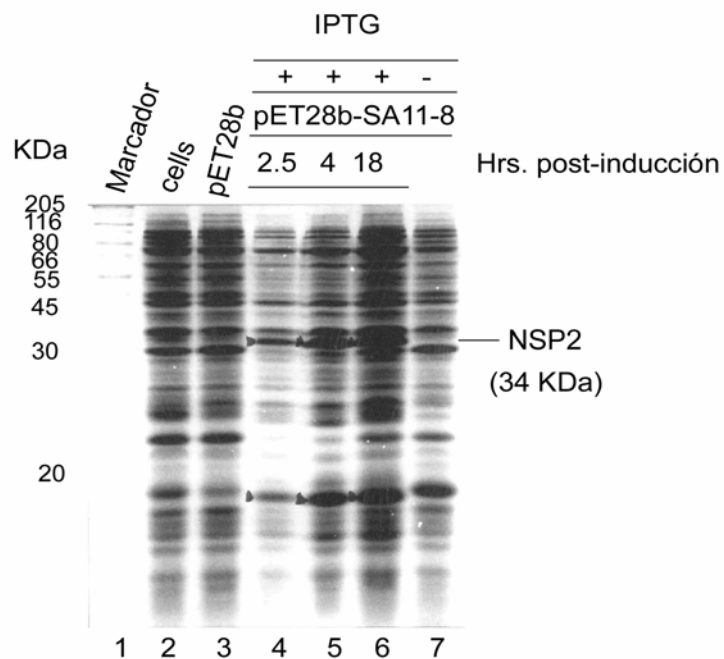


Figura 15. Análisis de proteínas totales para detectar la expresión de la proteína recombinante NSP2 a diferentes tiempos post-inducción mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS) y tinción con azul de Coomassie. 1) Marcador de peso molecular, 2) lisado de BL21-DE3, 3) lisado de BL21-DE3-pET28b, 4) lisado de BL21-DE3-pET28b-SA11-8 clona 1.1 inducido 2.5 hrs, 5) lisado de BL21-DE3-pET28b-SA11-8 clona 1.1 inducido 4 hrs., 6) lisado BL21-DE3- pET28b-SA11-8 clona 1.1 inducido 18 hrs., 7) listado BL21-DE3-pET28-SA11-8 clona 1.1 no inducido. A la derecha del gel se indica la posición esperada de la proteína recombinante NSP2. El triángulo negro señala la ubicación de NSP2 y en la parte inferior del gel, un posible producto de degradación

Una vez demostrada la expresión de la proteína NSP2 en bacteria, se purificó por medio de una columna de níquel basándose en la afinidad que presenta la cola de histidinas agregada a la NSP2 recombinante por este metal. Como se puede apreciar en la figura 16 (carril 5), se detectó en el eluido de la muestra de pET28-SA11-8 una banda que corresponde con el peso molecular de NSP2 (34 kDa). Cabe señalar que se pierde una cantidad importante de la proteína en la fracción de flujo (carril 3). También se detectó la proteína de 14 kDa. Esto indica que efectivamente se trata de NSP2, y que esta fracción corresponde al extremo carboxilo de la proteína, ya que fue en dicho extremo de la proteína en que fue añadida la cola de histidinas que permite la unión a la columna. El adicionar diferentes concentraciones conocidas de albúmina, permitió cuantificar la cantidad de proteína NSP2 recombinante, la cual se estimó mediante densitometría en 100 $\mu\text{g/ml}$.

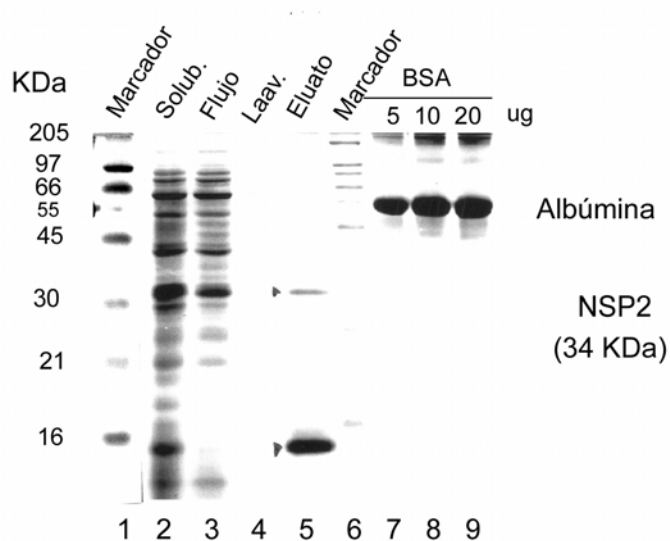


Figura 16.- Purificación por columna Ni-NTA de pastillas de proteínas de *E. coli* inducidas para expresión y solubilizadas con urea. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones denaturalizantes (SDS) y tinción con azul de Coomassie de proteínas solubilizadas, flujo, lavado y eluido de la purificación por columna de Ni-NTA, así como diferentes concentraciones de albúmina de suero fetal de bovino (BSA), para cuantificar la cantidad de proteína NSP2 recombinante. 1) Marcador de peso molecular, 2) BL21-DE3-pET28b-SA11-8 solubilizado, 3) BL21-DE3-pET28b-SA11-8 flujo, 4) BL21-DE3-pET28b-SA11-8 lavado, 5) BL21-DE3-pET28b-SAS11-8 eluato, 6) marcador de peso molecular, 7) 5 µg de BSA , 8) 10 µg de BSA, 9) 20 µg de BSA. Al lado derecho del gel se indica la ubicación esperada para las proteínas NSP2 y albúmina. Con un triangulo se indica la presencia de la proteína NSP2 recombinante.

Obtención de un suero hiperínmune anti-NSP2.

Una vez que se obtuvo la proteína NSP2 purificada, esta se utilizó para la obtención de un suero hiperínmune anti-NSP2. Como puede apreciarse en la figura 17, el suero obtenido presenta especificidad por NSP2 (figura 17 B) en células MA104 infectadas por rotavirus SA11 y no da señal en células no infectadas (figura 17 A). Como control negativo adicional, se utilizaron células MA104 infectadas por rotavirus, las cuales fueron incubadas con el anticuerpo secundario, pero sin el suero anti-NSP2 (figura 17 C), no encontrando ninguna señal. Estos datos indican que el suero hiperínmune es específico para NSP2.

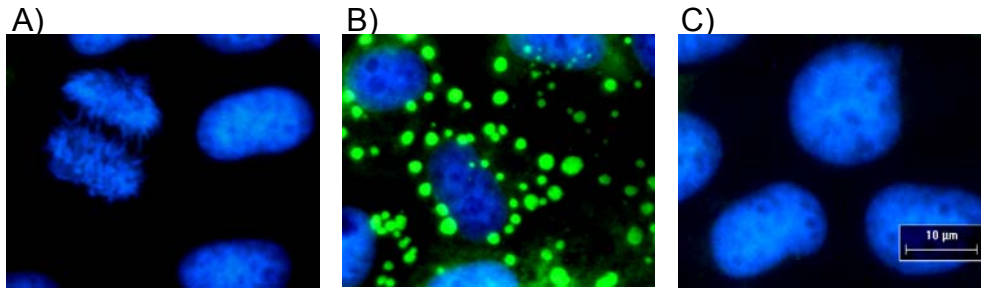


Figura 17.- Evaluación del suero hiperinmune anti-NSP2 en células infectadas por rotavirus. Células de Riñón de mono MA104 fueron infectadas con el rotavirus SA11, 24 hrs. post-infección fueron fijadas, e incubadas con el suero anti-NSP2. La localización subcelular de NSP2 fue determinada por microscopía de inmunofluorescencia. Como control negativo se utilizaron células sin infectar y los núcleos fueron teñidos con DAPI. A) MA104 no infectadas, B) MA104 infectadas con rotavirus y C) MA104 infectadas con rotavirus incubadas solamente con el anticuerpo secundario y sin el suero anti-NSP2. La barra indica 10 micrones.

Los viroplasmas de rotavirus “enjaulados” por los microtúbulos.

Basados en los datos reportados en la literatura, en donde se describe una participación activa de los microtúbulos durante la replicación de rotavirus, decidimos explorar la hipótesis de una posible asociación entre la formación de los viroplasmas con los microtúbulos. Para ello, comenzamos utilizando ensayos de co-inmunolocalización en células infectadas por rotavirus. Los viroplasmas fueron visualizados con un suero anti-NSP5 24 hrs. post-infección, mientras que los microtúbulos con un anticuerpo monoclonal anti β -tubulina. Lo que observamos es que no hay una completa co-localización de los viroplasmas con los microtúbulos (la presencia de color amarillo sugiere co-localización), más bien, los viroplasmas parecen estar embebidos por una red de microtúbulos (figura 18). Este dato sugiere que los microtúbulos podrían participar en la formación de los viroplasmas, por lo que decidimos explorar este punto más a fondo.

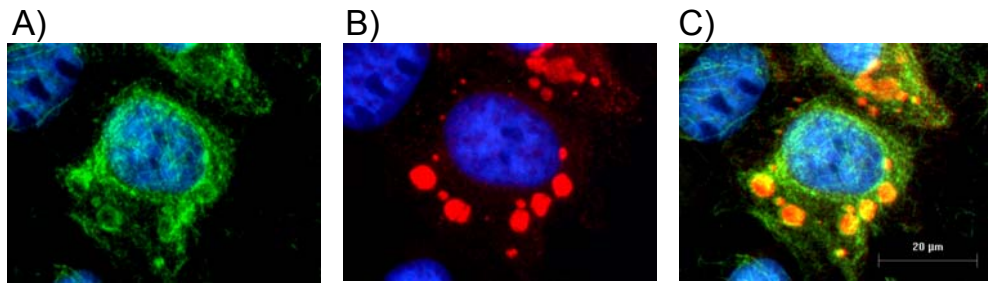


Figura 18. Co-localización intracelular de los viroplasmas y microtúbulos. Células infectadas por el rotavirus SA11 fueron fijadas 24 hrs. post-infección e incubadas con anticuerpos específicos para determinar la ubicación de los viroplasmas (detectando a NSP5) y microtúbulos por microscopía de fluorescencia. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. A) Células infectadas por rotavirus, B) viroplasmas visualizando a NSP5 y C) imagen super-impuesta de las dos anteriores, donde la presencia de color amarillo sugiere co-localización. La barra indica un tamaño de 20 micrones.

Los microtúbulos son fundamentales para la formación de los viroplasma de rotavirus.

Basados en que la superficie de los viroplasma co-localiza con los microtúbulos decidimos analizar la posibilidad de que los microtúbulos participaran en la formación de los viroplasma de rotavirus. Para abordar este punto se utilizó la droga nocodazol, la cual interfiere con la estructura y función de los microtúbulos. La droga se añadió a células infectadas con rotavirus SA11, a diferentes tiempos post-infección y se determinó la posible presencia de los viroplasma por microscopía de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos anti-NSP5. La figura 19 A, muestra los viroplasma normales obtenidos 18 hrs. post-infección y en ausencia de la droga. Cuando la droga se añade al inicio de la infección (una hora después de haber sido infectadas), los viroplasma se visualizan como estructuras granulares distribuidas a través del citoplasma de la célula infectada (figura 19B). Esta distribución de los viroplasma se mantiene en condiciones en las que el nocodazol es adicionado 4 hrs. después de haber sido infectadas las células (figura 19 C), es decir, los viroplasma se visualizan como pequeños gránulos distribuidos a través de todo el citoplasma. Sin embargo, cuando la droga se añadió a las 8 hrs. post-infección, se observaron viroplasma de tamaño intermedio (figura 19 D), sugiriendo que el crecimiento de los viroplasma se detiene en el momento en que se adiciona la droga. Finalmente, si el nocodazol es adicionado 18 hrs. post-infección, los viroplasma no muestran modificación alguna en su morfología (figura 19 E). Estos datos en su conjunto sugieren que el crecimiento de los viroplasma es detenido si se altera la funcionalidad de los microtúbulos.

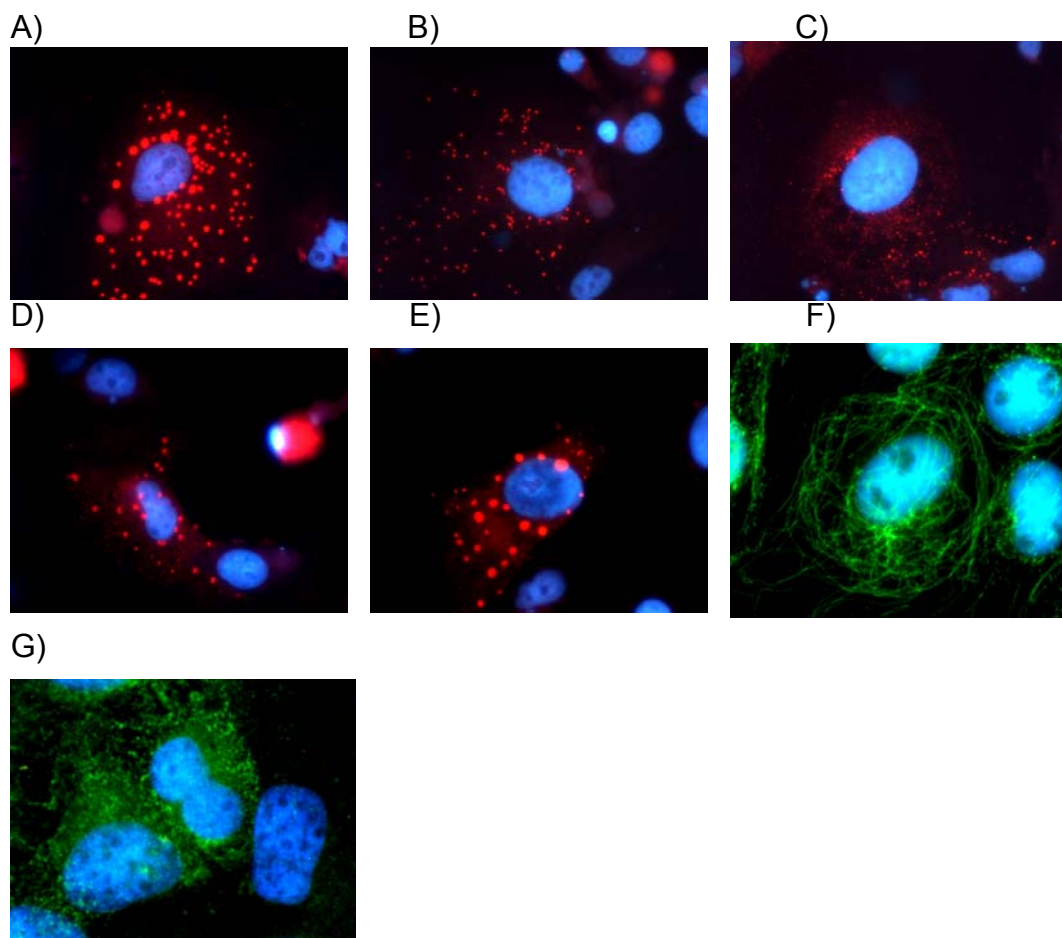


Figura 19. Efecto del nocodazol sobre la formación de los viroplasmas de rotavirus. Células infectadas con el rotavirus SA11 fueron fijadas 18 hrs. post-infección e incubadas con el suero anti-NSP5 para visualizar los viroplasmas ó con anti-tubulina para visualizar microtúbulos por microscopía de fluorescencia. Nocodazol fue adicionado 1 hora, 4hrs., 8hrs. post-infección (P.I), ó bien una hora antes de fijar las células. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. A) Viroplasmas 18 hrs. P.I., B) viroplasmas 18 hrs. P.I. con nocodazol adicionado desde 1 hora P.I., C) viroplasmas 18 hrs. P.I. con nocodazol desde 4 hrs. P.I., D) viroplasmas 18 hrs. P.I. con nocodazol desde 8 hrs. P.I., E) viroplasmas 18 hrs. P.I. con nocodazol añadido solo 1 hora antes de fijar, F) microtúbulos de células sin nocodazol y G) microtúbulos bajo el efecto de nocodazol durante 2 horas.

La proteína más abundante de los viroplasma co-inmunoprecipita con tubulina.

Los datos obtenidos anteriormente utilizando el interferente de microtúbulos, nocodazol en células infectadas por rotavirus nos sugerían una asociación entre los viroplasma y los microtúbulos de células infectadas con rotavirus. Sin embargo, la evidencia era solo indirecta, ya que hasta el momento no se había demostrado una interacción física entre algún componente de los viroplasma con los microtúbulos. Para abordar este problema, nos propusimos utilizar ensayos de co-inmunoprecipitación para determinar si podría haber una interacción entre NSP2, la proteína más abundante de los viroplasma con tubulina, sub-unidad estructural de los microtubulos.

NSP2 fue inmunoprecipitada por los anticuerpos anti-tubulina a partir de células infectadas por rotavirus y no de células sin infectar (figura 20), sugiriendo que los viroplasma podrían estar unidos físicamente a los microtúbulos durante la infección por rotavirus.

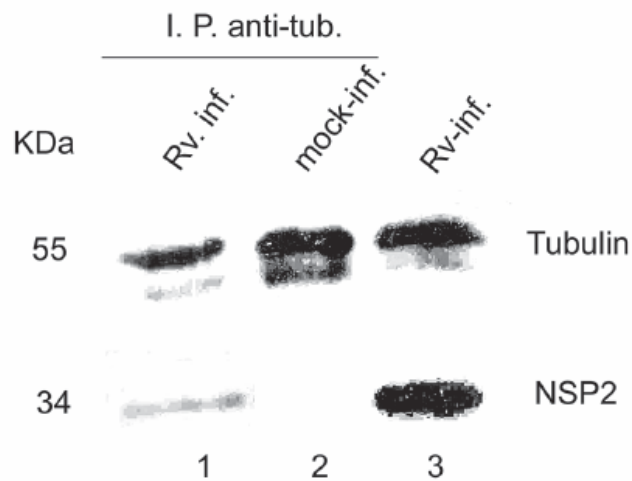


Figura 20. Co-inmunoprecipitación de NSP2 con tubulina a partir de células infectadas por rotavirus. Partiendo de un lisado de células infectadas con el rotavirus SA11 se inmunoprecipitó con anti-tubulina y se sometió por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS) en buffer Laemli. La presencia de NSP2 fue determinada por Western blot con anticuerpos anti-NSP2. 1) Células infectadas por rotavirus inmunoprecipitadas (I.P.) con anticuerpos anti-tubulina, 2) células no infectadas I. P. con anticuerpos anti-tubulina y 3) células infectadas por rotavirus.

Expresión de VP2, NSP2 y NSP5 en células de mamífero.

Para la obtención de las proteínas VP2, NSP2 y NSP5 en células BSC1, los segmentos genómicos 2, 8 y 11 del rotavirus SA11 fueron clonados en el vector pVOTE1. La secuencia de las 3 construcciones fue analizada por secuenciación automatizada previamente. Para su expresión transitoria se utilizó el sistema híbrido del virus vaccinia-T7 y las proteínas recombinantes fueron detectadas por Western blot, utilizando anticuerpos específicos contra cada proteína viral. La figura 21 muestra la expresión individual de VP2, NSP2 y NSP5 en células BSC1. Como control de carga se detectó a la actina y células infectadas por rotavirus como control positivo. Las tres proteínas virales fueron expresadas en nivel similar al encontrado en células infectadas, excepto NSP2, cuya expresión fue menor (aprox. 50% menor) que en células infectadas por rotavirus.

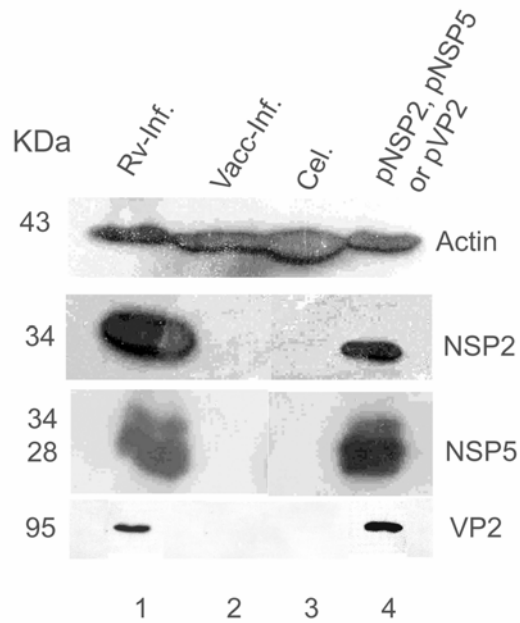


Figura 21. Expresión de NSP2, VP2 y NSP5 utilizando el sistema híbrido del virus vaccinia-T7 en células BSC1. Las proteínas virales NSP2, VP2 y NSP5 fueron expresadas utilizando el sistema híbrido del virus vaccinia y detectadas por Western blot con anticuerpos específicos contra cada proteína. 1) Células infectadas por rotavirus como control positivo, 2) células infectadas con el virus vaccinia y transfectadas con el vector vacío, como control negativo, 3) células BSC1 y 4) expresión de NSP2, VP2 ó NSP5 por el sistema híbrido. Actina fue detectada en todas las muestras como un control endógeno. .

Distribución intracelular de NSP2, NSP5, y VP2 en células infectadas por rotavirus.

Con el objetivo de determinar la distribución subcelular de NSP2, NSP5, y VP2, células MA104 fueron infectadas con el rotavirus SA11, fijadas a las 8 hrs. post-infección y expuestas a anticuerpos específicos por microscopía de fluorescencia. Como puede apreciarse en la figura 22, las tres proteínas virales fueron ubicadas en los viroplasmos, como anteriormente había sido descrito.

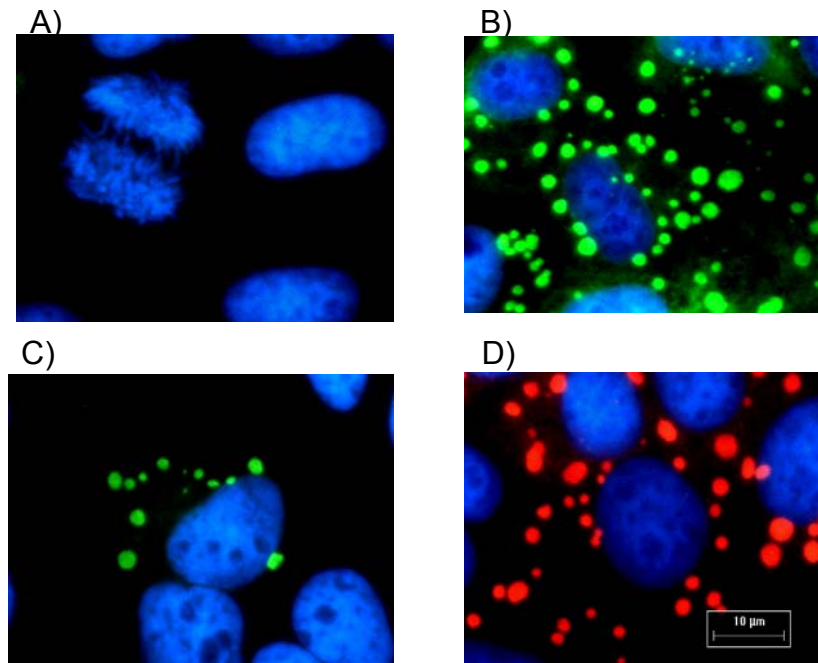


Figura 22. Distribución intracelular de NSP2, NSP5, y VP2 en células infectadas por rotavirus. Células de Riñón de mono MA104 infectadas con rotavirus fueron fijadas 18 hrs. post-infección. La distribución intracelular de NSP2, VP2 y NSP5 fue determinada por microscopía de fluorescencia utilizando anticuerpos específicos contra cada proteína. A) Control negativo de células no infectadas, B) distribución intracelular de NSP2, C) distribución intracelular de VP2 y D) distribución intracelular de NSP5. La barra indica un tamaño de 10 micrones.

Los VLS están asociados a microtúbulos.

En función de que los viroplasmos de rotavirus están compuestos por varias proteínas y RNA viral, y partiendo del hecho de que NSP2 y NSP5 representan las proteínas elementales para la formación de los viroplasmos, decidimos, determinar si NSP2, NSP5 ó ambas se unen a los microtubulos en la ausencia del resto de las proteínas virales. Para analizar esta hipótesis se utilizaron ensayos de co-inmunoprecipitación. A partir de células co-expresando a NSP2 y NSP5 se inmunoprecipitó la tubulina y se realizó un Western blot contra las proteínas NSP2 y NSP5, encontrándose que tanto NSP2 como NSP5 co-precipitaron con anti-tubulina y no cuando se inmunoprecipita con un anticuerpo no relacionado como anti-actina, utilizado como control negativo (figura 23). Estos datos sugieren que NSP5 se une a tubulina por lo que ambas proteínas podrían ser el puente de unión entre los viroplasmos y los microtúbulos. Adicionalmente se infiere que las demás proteínas que constituyen los viroplasmos podrían ser dispensables en dicha unión.

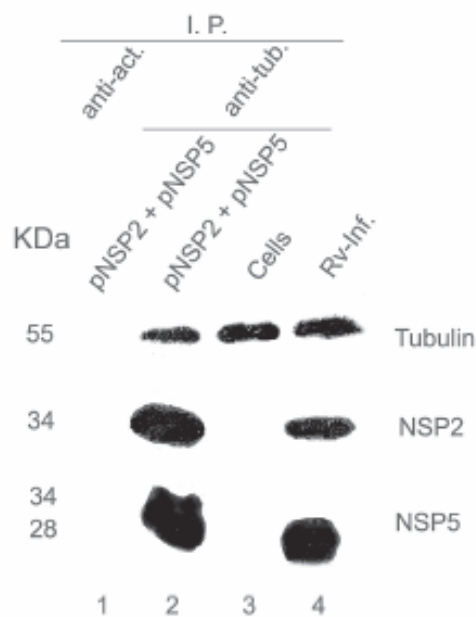


Figura 23. Co-inmunoprecipitación de NSP2 ó NSP5 con tubulina co-expresadas en forma transitoria en células por el sistema híbrido del virus vaccinia-T7. Las células se infectaron con el virus vaccinia vTF7-3 y se co-transfectaron con pNSP2 y pNSP5. NSP2 ó NSP5 fueron co-inmunoprecipitadas con anti-tubulina y su presencia determinada por Western blot con el anticuerpo correspondiente (anti-tubulina, anti-NSP2, o anti-NSP5). 1) Células co-transfectadas con pNSP2 y pNSP5 inmunoprecipitadas (I. P.) con anti-actina, como control negativo, 2) células co-transfectadas con pNSP2 y pNSP5 I. P. con anti-tubulina, 3) células I. P. con anti-tubulina, y 4) células infectadas con rotavirus.

NSP2 y NSP5 expresadas individualmente se unen a los microtúbulos.

Con la intención de analizar si NSP2 ó NSP5 expresada en forma individual podrían unirse a los a microtúbulos, o sí dependen la una de la otra para dicha actividad, ambas proteínas se expresaron en forma individual y transitoria en células por medio del sistema híbrido del virus vaccinia-T7 y se inmunoprecipitaron con anti-tubulina. La presencia de NSP2 ó NSP5 fue determinada por Western blot, utilizando anticuerpos específicos contra cada proteína. Lo que se encontró fue que tanto NSP2 como NSP5 fueron co-inmunoprecipitadas con anti-tubulina y no co-inmunoprecipitan cuando se utilizan anticuerpos no-relacionados como anti-actina (figura 24). Este resultado indica que tanto NSP2 como NSP5 tienen la capacidad de unirse directamente a los microtúbulos, sin depender la una de la otra, indicando que ambas podrían constituir el puente de unión entre los viroplasmos con los microtúbulos.

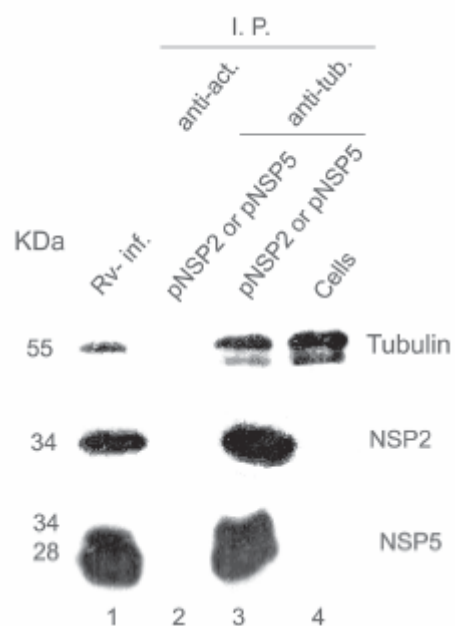


Figura 24. NSP2 y NSP5 expresadas individualmente co-inmunoprecipitan con tubulina. NSP2 y NSP5 fueron expresadas individualmente en células utilizando el sistema híbrido del virus vaccinia y se inmunoprecipitaron con anti-tubulina y su presencia determinada por Western blot. 1) Células infectadas con rotavirus, 2) células expresando a NSP2 o bien a NSP5 inmunoprecipitadas (I.P.) con anti-actina, 3) células expresando a NSP2 o bien a NSP5 I.P. con anti-tubulina, y 4) células I.P. con anti-tubulina.

Asociación de NSP2 y/o NSP5 con los microtúbulos en células infectadas por rotavirus a diferentes tiempos post-infección.

Una vez analizada la capacidad de NSP2 y NSP5 de unirse a los microtúbulos en forma individual e independiente, nos propusimos estudiar la dinámica de la asociación entre NSP2 ó NSP5 con los microtúbulos en células infectadas por rotavirus a diferentes tiempos post-infección, para analizar si ambas proteínas virales se unen a los microtúbulos tan pronto como son sintetizadas. Para lograr esto se obtuvieron lisados de células infectadas con rotavirus a 4, 12, o 24 hrs. post-infección y se co-inmunoprecipito con anti-tubulina y la presencia de NSP2 o NSP5 fue determinada por Western blot. En condiciones experimentales se encontró que NSP2 se une a los microtúbulos a las 4 hrs. post-infección y antes que NSP5 (figura 25 A, carril 3), mientras que NSP5 se une hasta las 12 hrs. post-infección. Como control se observó que ninguna de las dos proteínas virales fue encontrada asociada a los microtúbulos cuando se inmunoprecipito con anti-actina, como control negativo (figura 25 A, carril 2). La máxima cantidad de NSP2 y NSP5 unidas a los microtúbulos se obtuvo a las 12 hrs. post-infección, disminuyendo la cantidad de ambas proteínas unidas a los microtúbulos a las 24 hrs. post-infección, siendo esto más evidente para el caso de NSP5 (figura 25 A, carril 5). Si el ensayo de coinmunoprecipitación con anticuerpos anti-tubulina se realizaba con el doble de la cantidad de células infectadas por rotavirus, NSP5 puede ser detectada desde las 4 horas post-infección. Estos datos sugieren que NSP2 se une a los microtúbulos tan pronto como es producida, que se une antes que NSP5 y que ambas permanecen asociadas a los microtúbulos hasta 24 hrs. post-infección, obteniéndose el máximo nivel de proteína unida a los microtúbulos a las 12 hrs. post-infección (figura 26).

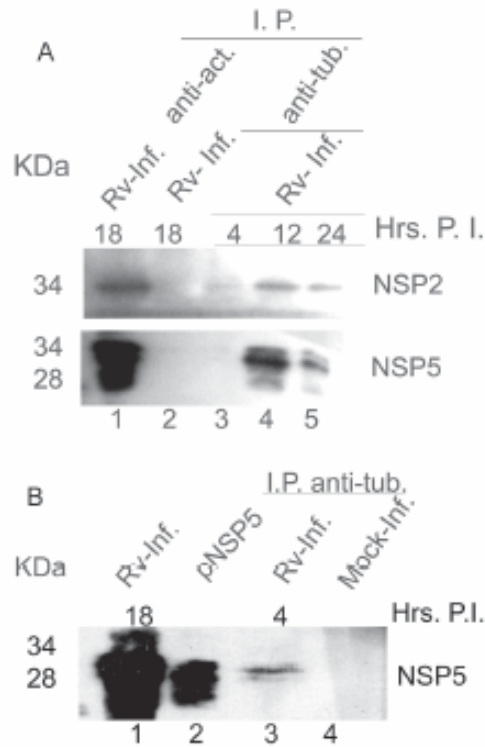


Figura 25. Asociación de NSP2 ó NSP5 con microtubulos en células infectadas con rotavirus a diferentes tiempos post-infección. Lisados de células infectadas con rotavirus fueron obtenidos a 4, 12, ó 24 hrs. post-infección. NSP2 ó NSP5 fueron co-inmunoprecipitados con anti-tubulina y su presencia determinada por Western blot. A) 1) células infectadas con rotavirus 18 hrs. post-infección, 2) células infectadas con rotavirus 18 hrs. post-infección e inmunoprecipitadas (I. P.) con anti-actina, 3) células infectadas con rotavirus 4 hrs. post-infección I. P. con anti-tubulina, 4) células infectadas con rotavirus 12 hrs. post-infección I. P. con anti-tubulina, y 5) células infectadas con rotavirus 24 hrs. post-infección I. P. con anti-tubulina. B) 1) células infectadas con rotavirus 18 hrs. post-infección I. P. con anti-tubulina. B) 1) células infectadas con rotavirus 18 hrs. post-infección, 2) células transfectedas con pNSP5, 3) células infectadas con rotavirus 4 hrs. post-infección (el doble de la cantidad utilizada en A) I. P. con anti-tubulina, y 4) células no infectadas I. P. con anti-tubulina.

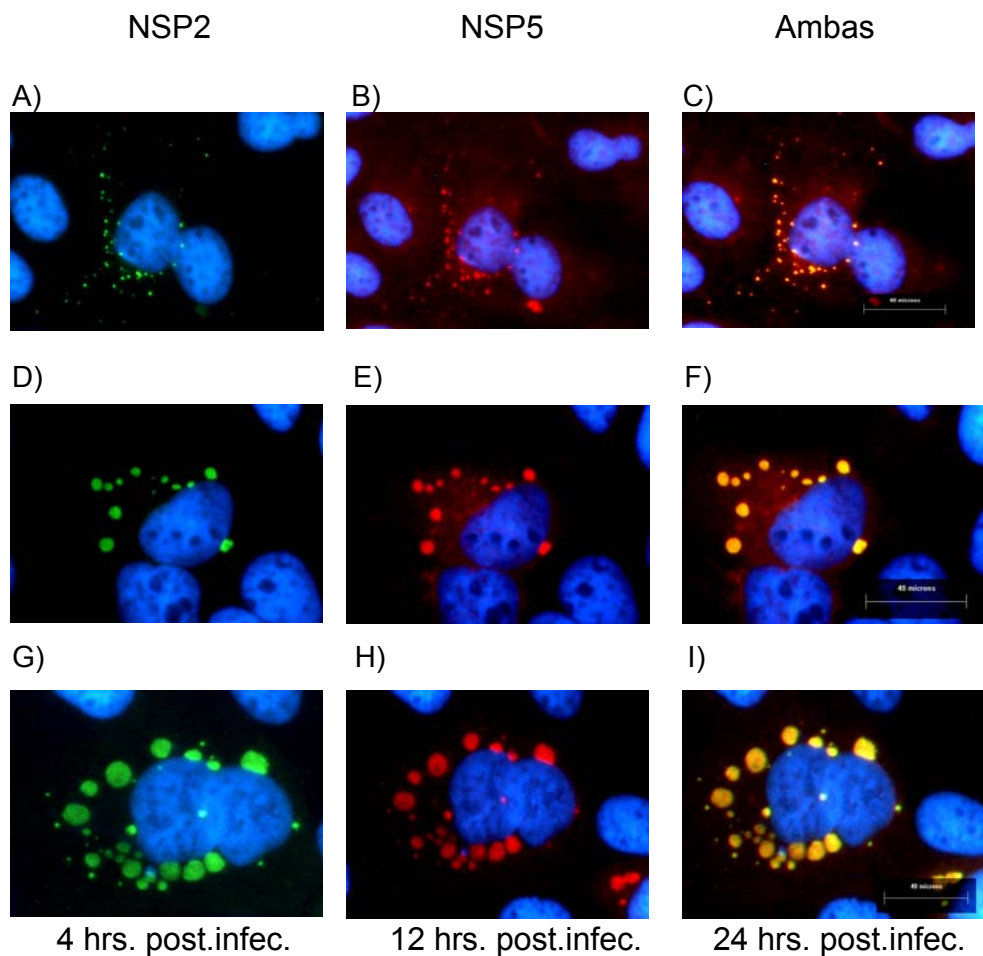


Figura 26. Viroplasmos de rotavirus a diferentes tiempos post-infección, visualizando a NSP2 ó NSP5. Células infectadas por rotavirus fueron fijadas a 4, 12, ó 24 hrs. post-infección y la localización intracelular de NSP2 ó NSP5 determinada por microscopía de fluorescencia. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. A) Células infectadas por rotavirus 4 hrs. post-infección (P. I.), detectando a NSP2, B) células infectadas por rotavirus 4 hrs. P. I., detectando a NSP5, C) imagen superimpuesta de A y B, D) células infectadas por rotavirus 12 hrs. P. I., detectando a NSP2, E) células infectadas por rotavirus 12 hrs. P. I., detectando a NSP5, F) imagen superimpuesta de D y E, G) células infectadas por rotavirus 24 hrs. P. I., detectando a NSP2, H) células infectadas por rotavirus 24 hrs. P. I., detectando a NSP5 e I) imagen superimpuesta de G y H. La barra indica 40 micrones.

NSP2 modifica la distribución intracelular de VP2.

Para abordar la posibilidad de que NSP2 pudiera interactuar con otras proteínas virales localizadas en los viroplasmos, nos propusimos analizar si NSP2 podría interactuar con VP2, para lo cual comenzamos por co-expresar dichas proteínas. NSP2, VP2, ó ambas se expresaron en forma transitoria por medio del sistema híbrido del virus vaccinia en células BSC1, y su localización intracelular fue determinada por microscopía de inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos específicos contra cada proteína. La figura 27 muestra que cuando NSP2 ó VP2 fueron expresadas en forma individual, ambas presentaron una distribución difusa a través de todo el citoplasma. Sin embargo, al ser co-expresadas se observaron agregados de morfología esférica distribuidas a través de todo el citoplasma (figura 27 C). Este dato sugiere que podría haber una interacción molecular entre ambas proteínas virales.

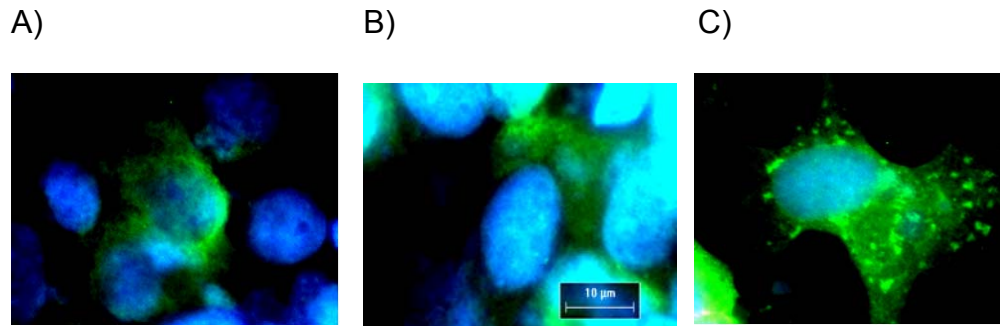


Figura 27. Distribución intracelular de NSP2 y VP2 expresadas en forma individual ó co-expresadas transitoriamente por el sistema híbrido del virus vaccinia. Células BSC1 fueron infectadas con el virus vTF7-3 y una hora post-infección, transfectadas con el plásmido correspondiente y 18 hrs. post-infección las células se fijaron y la distribución intracelular de NSP2, VP2 y ambas fue determinada por microscopía de inmunofluorescencia. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. A) Distribución intracelular de NSP2, B) distribución intracelular de VP2, y C) distribución intracelular de NSP2 y VP2. La barra indica 10 micrones.

NSP2 y VP2 interactúan molecularmente.

Basados en los datos de inmunofluorescencia donde la distribución intracelular de NSP2 y VP2 se modifica si ambas proteínas son co-expresadas, decidimos buscar evidencia de una posible interacción molecular entre estas proteínas virales, para lo cual utilizamos ensayos de co-inmunoprecipitación en células transfectadas que expresen a NSP2 y VP2. Encontramos que a partir de células transfectadas con los plásmidos pNSP2 y pVP2, inmunoprecipitando con anticuerpos anti-VP2, se detectó la presencia de NSP2 por Western blot (figura 28, carril 2), pero no en células transfectadas solo con pVP2 , pNSP2 o plásmido vacío e inmunoprecipitadas con anti-VP2. La eficiencia de la técnica de inmunoprecipitación fue determinada al co-inmunoprecipitar a NSP2 con anti-tubulina (figura 28, carril 3), dato anteriormente encontrado en el laboratorio. La interacción entre NSP2 y VP2 fue corroborada en forma inversa, es decir al inmunoprecipitar con anti-NSP2 y detectar la presencia de VP2 por Western blot (dato no mostrado). Estos datos señalan que NSP2 y VP2 interactúan molecularmente en la ausencia del resto de las proteínas virales.

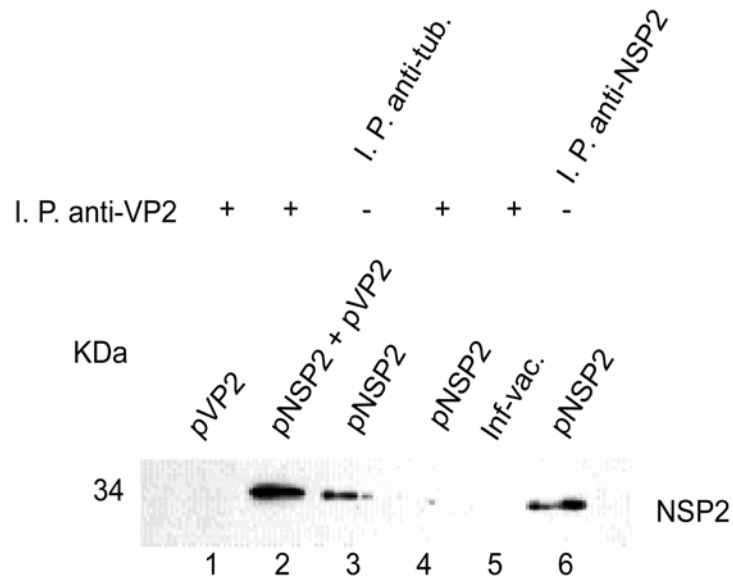


Figura 28. Co-inmunoprecipitación de NSP2 con anticuerpos anti-VP2. Células BSC1 infectadas con el virus vTF7-3 fueron transfectadas 1 hora post-infección con pNSP2, pVP2 ó ambos y 18 hrs. post-infección se lisaron las células, se inmunoprecipitó con anti-VP2 (anti-tubulina ó anti-NSP2 como controles positivos) y la presencia de NSP2 determinada por Western blot. 1) Células transfectadas con pVP2 e inmunoprecipitadas (I. P.) con anti-VP2, 2) células transfectadas con pVP2 y pNSP2 e I. P. con anti-VP2, 3) células transfectadas con pNSP2 e I. P. con anti-tubulina como control positivo, 4) células transfectadas con pNSP2 e I. P. con anti-VP2, 5) células infectadas con vaccinia y transfectadas con el vector vacío e I. P. con anti-VP2, 6) células transfectadas con pNSP2 e I. P. con anti-NSP2.

DISCUSIÓN

La replicación y ensamble de los virus generalmente tiene lugar en sub-compartimentos específicos dentro de las células infectadas. El citoplasma es el sitio favorito de los virus que pertenecen a la familia *Reoviridae*. El prototipo de la familia que es reovirus requiere de una red intacta de microtúbulos para su replicación (Dales 1963; Parker *et al.*, 2002), y otros miembros de esta familia como los virus de la lengua azul (BTV) forman sus cuerpos de inclusión asociados a los filamentos intermediarios (Eaton *et al.*, 1987). En este trabajo nosotros presentamos evidencia de la importancia de los microtúbulos en la formación de los viroplasma de rotavirus, así como una nueva interacción entre las proteínas NSP2 y VP2, ambas componentes importantes de los viroplasma.

Mediante el uso de microscopía de inmunofluorescencia se visualizaron tanto los viroplasma como los microtubulos en células infectadas por rotavirus con anticuerpos anti-NSP5 y anti-tubulina correspondientemente. Se encontró que la superficie de los viroplasma colocaliza con los microtubulos, dando la impresión de que los viroplasma se encuentran “enjaulados” por los microtúbulos. Este resultado sugería una interacción de los microtúbulos con los viroplasma, por lo que decidimos estudiar si los microtúbulos podrían ser necesarios para la formación de los viroplasma.

Encontramos evidencia de que la formación de los viroplasma necesita una red funcional de microtubulos. Cuando el inhibidor de la polimerización de los microtúbulos, nocodazol fue añadido a células infectadas por rotavirus a diferentes tiempos post-infección, el crecimiento de los viroplasma fue detenido, sin embargo siempre observamos viroplasma puntuales cuando la droga se añadió desde la etapa temprana de la infección. Estos datos sugieren que nocodazol no interfiere con los eventos tempranos de la formación de los viroplasma, es decir, con lo que podría considerarse como el “sembrado” de estos, sino que es el crecimiento de los viroplasma el que es detenido. El crecimiento de los viroplasma ha sido propuesto como dependiente de la adición de sus componentes así como la fusión de

viroplasmos preformados (Eichwald *et al.*, 2005). Nosotros encontramos que los viroplasmos dejan de crecer en la presencia de la droga, como sí el nocodazol previniera la fusión ó la adición de los componentes de los viroplasmos.

Dado que nuestros datos sugerían una dependencia de una red funcional de microtúbulos para el crecimiento de los viroplasmos, nos propusimos investigar si podría haber una asociación directa entre NSP2, la proteína más abundante de los viroplasmos y los microtúbulos, para lo cual NSP2 se co-inmunoprecipitó con anticuerpos anti-tubulina a partir de células infectadas, sugiriendo que los viroplasmos podrían estar unidos físicamente a los microtúbulos en células infectadas por rotavirus.

Basados en que los principales componentes de los viroplasmos son NSP2 y NSP5, dado que estas proteínas son suficientes para formar VLS (estructuras similares a los viroplasmos), nos propusimos buscar evidencia de una posible interacción entre los VLS con los microtúbulos al co-expresar a NSP2 y NSP5, o bien expresadas individualmente por el sistema vaccinia y co-inmunoprecipitar con anti-tubulina. Encontramos que tanto NSP2 como NSP5 co-inmunoprecipitan con tubulina, sugiriendo que estas proteínas son las responsables de la asociación entre los viroplasmos de rotavirus con los microtúbulos. Aunque no se puede descartar la participación de otras proteínas virales en la unión de los viroplasmos a los microtúbulos, si parecen ser dispensables.

Otras proteínas de rotavirus están asociadas a los microtubulos durante la infección, como NSP4 y VP4 (Xu *et al.*, 2000; Nejmeddine *et al.*, 2000), pero ninguna se encuentra localizada en los viroplasmos y VP4 aparentemente es ensamblada sobre partículas de doble capa (DLPs) preformadas en la etapa final de morfogénesis, mientras que NSP4 parece ser incorporada en DLPs que geman al Retículo Endoplásmico e interesantemente también afecta el

crecimiento de los viroplasmos como se demostró al interferir con su función con RNA interferente (RNAi) (López *et al.*, 2005).

Asociación de otras proteínas virales con los microtubulos han sido demostradas por ensayos de co-inmunoprecipitación, tal como la proteína de matriz VP40 del virus Ebola (Ruthel *et al.*, 2005). Adenovirus se une a los microtúbulos en un proceso mediado por dineina (Kelkar *et al.*, 2004). No sabemos sin embargo, si la asociación de NSP2 y NSP5 con los microtúbulos es directamente con tubulina o mediada por otras proteínas como las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs).

Al explorar un poco como podría darse la dinámica de la asociación tanto de NSP2 como de NSP5 en células infectadas por rotavirus, encontramos que NSP2 se une a los microtúbulos tan pronto como 4 hrs. después de la infección y primero que NSP5, mientras que NSP5 se unió a los microtúbulos hasta las 12 hrs. post-infección, cuando el nivel de NSP2 fue máximo. El hecho de que NSP2 se una primero que NSP5 a los microtúbulos podría indicar que el mecanismo de formación de los viroplasmos es un proceso secuencial en el cual NSP2 podría tener un papel fundamental en reclutar a NSP5 y el resto de las proteínas que forman los viroplasmos. Previamente, ha sido reportado que un rotavirus mutante con una lesión sensible a temperatura en el gen de NSP2, no forma viroplasmos (Ramig and Petrie 1984), sugiriendo un papel esencial de NSP2 en la formación de los viroplasmos.

Los niveles más altos de NSP2 y NSP5 asociadas a los microtubulos se registraron a las 12 hrs. post-infección, coincidiendo con el nivel máximo de síntesis tanto de RNA de cadena positiva como negativa (Stacy-Phipps and Patton 1987), así como máxima producción de virus infeccioso (McCrae and Faulkner-Valle 1981). Este dato resulta particularmente interesante ya que tanto NSP2 como NSP5 están involucradas en la replicación de rotavirus, específicamente en el empaquetado de los 11 segmentos de RNA de cadena

doble dentro de partículas subvirales en formación. Finalmente, ambas proteínas permanecen asociadas a los microtúbulos 24 hrs. post-infección, aunque la cantidad de proteína unida disminuye, siendo esto más evidente en el caso de NSP5, en la cual se observa una reducción de aproximadamente 50%. Este comportamiento podría explicarse como una disminución en la síntesis de NSP5 a este tiempo de la infección.

Por otro lado, se detectó una nueva interacción entre NSP2 y VP2, ambas componentes de los viroplasmos. El primer acercamiento se realizó por medio de microscopía de inmunofluorescencia en células que expresaban transitoriamente a NSP2, VP2 ó bien a ambas, encontrándose que al ser co-expresadas se modificaba su distribución intracelular de difusa a estructuras granulares similares a los VLS. Esta probable interacción fue demostrada posteriormente por ensayos de co-inmunoprecipitación a partir de células que expresaban tanto a NSP2 como VP2, obteniendo de esta forma datos moleculares que demostraban dicha interacción. Estos datos apoyan la hipótesis de que NSP2 podría ser la proteína encargada de reclutar a las proteínas que forman los viroplasmos durante las etapas tempranas de la infección. Previamente se había obtenido evidencia por ensayos *in vitro* de una posible interacción entre VP2 y NSP5 (Berois *et al.*, 2003), así como de la interacción de NSP2 con VP1 por inmunoprecipitación a partir de células infectadas por rotavirus (Aponte *et al.*, 1996), datos que sugieren que dentro de los viroplasmos se llevan a cabo múltiples interacciones entre las diferentes proteínas que los conforman.

APORTACIONES AL CAMPO

En este trabajo se presenta evidencia por primera vez de la participación de un elemento celular en la formación de los viroplasmos de rotavirus. Dado que los viroplasmos están constituidos principalmente por proteínas y RNA virales, los grupos de investigación especializados, se habían enfocado solamente en el estudio de las proteínas virales, dejando de lado la posible participación de elementos celulares. Nosotros encontramos que los microtúbulos juegan un papel fundamental, sobre todo en el crecimiento de los viroplasmos. Este dato es de relevancia importancia, si se toma en cuenta que sin viroplasmos completamente formados, rotavirus es incapaz de llevar a cabo su replicación y ensamble de partículas virales infecciosas.

También se demostró en forma molecular la participación de NSP2 y NSP5 en la asociación de los viroplasmos con los microtúbulos, sugiriendo ser el puente entre ambas estructuras. Sumando la nueva interacción encontrada entre NSP2 y VP2, se podría especular que NSP2 tenga un papel esencial en las etapas tempranas de la infección, donde se fundamenta la formación de los viroplasmos. Tomando todos los datos generados en su conjunto sugieren que el mecanismo de formación de los viroplasmos podría ser un proceso secuencial en donde NSP2 primero se anclaría a los microtúbulos para posteriormente reclutar a los diferentes componentes de los viroplasmos como NSP5 y VP2 dada su capacidad para interaccionar con otras proteínas virales localizadas en los viroplasmos.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación contribuyen en forma sustancial al campo de los rotavirus, al generar información básica de los eventos tempranos que se llevan a cabo para concluir en la formación de los viroplasmos de rotavirus.

BIBLIOGRAFÍA

Adams W. R., and Kraft L. M.. (1963). Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*. 141; 359-60.

Allen A. M., and Desselberger U.. (1965). Reassortment of human rotaviruses carrying rearranged genomes with bovine rotavirus. *J. of Gen. Virol.* 66; 2703-14.

Altenburg B. C., Graham D. Y., and Estes M. K.. (1980). Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. *J. of Gen. Virol.* 46; 75-85.

Ansari S. A., Springthorpe S., and Sattar S. A.. (1991). Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev. Infect. Dis.* 13; 448-61.

Au K-S, Chan W-K, and Estes M. K.. (1989). Rotavirus morphogenesis involves an endoplasmic reticulum transmembrane glycoprotein. *Cells biology of virus entry. Replication and pathogenesis*. New York: Alan R Liss; 257-67.

Bass G. M., and Greenberg H. B.. (1991). Pathogenesis of viral gastroenteritis. In: M. Fields, ed. *Diarrheal diseases: current topics in gastroenterology*. New York: Elsevier, 139-57.

Bastardo J. W., and Holmes I. H.. (1980). Attachment of SA-11 rotavirus to erythrocyte receptors. *Infect. Immun.*, 29; 1134-40.

Bellamy A. R., and Both G. W.. (1990). Molecular biology of rotaviruses. *Adv. Virus Res.* 38; 1-44.

Bellinzoni R. C., Mattion N. M., Burrone O., Gonzalez A., La Torre J. L., and Scodeller E. A.. (1987). Isolation of group A swine rotaviruses displaying atypical electropherotypes. *J. Clin. Microbiol.* 25; 952-54.

Bern C., and Glass R. I.. (1994). Impact of diarrheal diseases worldwide. In: A. Z. Kapikian, ed. *Viral Infections of the gastrointestinal tract*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1-26.

Bican P., Cohen J., Charpilienne A., and Scherrer R.. (1988). Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J. Virol.* 43; 1113-17.

Bishop R. F., Davidson G. P., Holmes I. H., and Ruck B. J.. (1974). Detection of a new virus by electron microscopy of fecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet.* 1: 149-51.

Biryahwaho B., Hundley F., and Desselberger U. (1987). Bovine rotavirus with arranged genome reassorts with human rotavirus. Brief report. *Arch. Virol.* 96; 257-64.

Black R. E., Merson M. H., Huq I., Alim A. R. M. A., and Yunus M.. (1981). Incidence and severity of rotavirus and *Escherichia coli diarrhoea* in rural Bangladesh. Implications for vaccine development. *Lancet.* 1; 141-43.

Both G. W., Lockett L. J., Janardhana V., Edwards S. J., Bellamy A. R., Graham F. L., Prevec L., Andrew M. E.. Protective immunity to rotavirus-induced diarrhoea is passively transferred to newborn mice from naïve dams vaccinated with a single dose of a recombinant adenovirus expressing rotavirus VP7sc. *Virology.* 193; 940-50.

Boyle J. F., and Holmes K. V.. (1986). RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J. Virol.* 58; 561-68.

Braine T.. (2005). Rotavirus vaccine introduction in Mexico sets precedent. *Bulletin of the World Health Organization.* 83(3), 167.

Brandt C. D., Kim H. W., Rodríguez W. J., *et al.* (1981). Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J. Clin. Microbiol.* 13; 976-81.

Bridger J. C., and Woode G. N.. (1976). Characterization of two Particle types of calf rotavirus. *J. Gen. Virol.* 31; 245-50.

Butz A. M., Fosarelli P., Dick J., Cusack T., and Yolken R.. (1993). Prevalence of rotavirus in high-risk fomites in day-care facilities. *Pediatrics.* 92; 202-05.

Charpilienne A. *et al.*, (1997). Solubilized and cleaved VP7, the outer glycoprotein of rotavirus, induces permeabilization of cell membrane vesicles. *J. Gen. Virol.* 78; 1367-71.

Chasey D.. (1977). Different particle types in tissue culture and intestinal epithelium infected with rotavirus. *J. Gen. Virol.* 37; 443-51.

Chemello M. E. *et al.*, (2002). Requirement of vacuolar H⁺ -ATPase activity and Ca²⁺ gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *J. Virol.* 76; 13083-87.

Chen D., Gombold J. L., and Ramig R. F.. (1990). Intracellular RNA synthesis directed by temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11. *Virology.* 178; 143-51.

Chen D., Zeng C. Q. Y., Gorziglia M., Estes M. K., and Ramig R. F.. (1994). Template-dependent, *in vitro* replication of rotavirus RNA. *J. Virol.* 68; 7030-39.

Ciarlet M., and Estes M.. (1999). Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J. Gen. Virol.* 80; 943-48.

Ciarlet M., *et al.* (2002). VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. *J. Virol.* 76; 1109-23.

Clark S. M., Roth J. R., Clark M. L., Barnett B. B., and Spendlove R. S.. (1981). Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *J. Virol.* 39; 816-22.

Clark S. M., Spendlove R. S., and Barnett B. B.. (1980). Role of two particle types in bovine rotavirus morphogenesis. *J. Virol.* 34; 272-76.

Cohen J., Laporte J., Charpilienne A., and Scherrer R.. (1979). Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* 60; 177-86.

Cook S. M., Glass R. I., LeBaron C. W., and Ho M. S.. (1990). Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ.* 68; 171-77.

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

Crawford S. E., Labbe M., Cohen J., Burroughs M. H., Zhou Y., and Estes M. K.. (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.* 68; 5945-52.

Das M., Dunn S. J., Woode G. N., Greenberg H. B., and Rao C. D.. (1993). Both surface proteins (VP4 and VP7) of an asymptomatic neonatal

strain (1321) have high levels of sequence identity with the homologous proteins of a serotype 10 bovine rotavirus. *Virology*. 194; 374.

Denisova, E. *et al.*, (1999). Rotavirus capsid protein VP5* permeabilizes membranes. *J. Virol.* 73; 3147-53.

Dowling W. *et al.*, (2000). Selective membrane permeabilization by the rotavirus VP5* protein is abrogated by mutations in an internal hydrophobic domain. *J. Virol.* 74; 6368-76.

Dunn J. D., Burns J. W., Cross T. I. and *et al.* (1994). Comparisons of VP4 and VP7 of five murine rotavirus strains. *Virology*. 203; 250-59.

Eichwald C., Jacob G., Muszinski B., Allende J. E., and Burrone O. E.. (2005). Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J. Gen. Virol.* 85: 625-34.

Eiden J. J., Wilde J., Firooz-Mand F., and Yolken R.. (1991). Detection of animal and human group B rotaviruses in fecal specimens by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29; 539-43.

Engleberg N. C., Holburt E. N., Barrett T. J., *et al.*. (1982). Epidemiology of diarrhea due to rotavirus on an Indian reservation: risk factors in the home environment. *J. Infect. Dis.* 145; 894-98.

Estes M. K., and Cohen J.. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 53; 410-49.

Estes M. K., Graham D. Y., Gerba C. P., and Smith E. M.. (1979). Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures. *J. Virol.* 31; 810-15.

Estes M. K. (2001). Rotavirus and their replication. In *Virology* (Knipe D. N. and Howley P.M., eds), pp. 1747-85., Lippincott Williams and Wilkins.

Fernández J., Sandino A., Yudelevich A., Avendano L. F., Venegas A., Hinrichsen V., and Spencer E.. (1992). Rotavirus detection by dot-blot hybridization assay using a non-radioactive synthetic oligodioxynucleotide probe. *Epidemiol. Infect.* 108; 175-84.

Fernelius A. L., Ritchie A. E., Classick L. G., Norman J. O., Mebus C. A.. (1972). Cell culture adaptation and propagation of a reovirus-like agent of calf diarrhea from a field outbreak in Nebraska. *Arch. Ges. Virusforschung.* 37; 114-30.

Flewett T. H., Bryden A. S., and Davies H.. (1973). Virus particles in gastroenteritis. *Lancet.* 2; 1497.

Flewett T. H., Bryden A. S., Davies H., Woode G. N., Bridger J. C., and Derrick J. M.. (1974). Relationship between virus from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet.* 2; 61-63.

Flores J., Boeggeman E., Purcell R. H., *et al.* (1983). A dot hybridization assay for detection of rotavirus. *Lancet.* 1; 555-59.

Fukuhara N., Yoshie O., Kitoaka S., Konno T.. (1988). Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *J. Virol.* 62; 2209-18.

Fukudome K., Yoshie O., and Konno T.. (1989). Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. *Virology.* 172; 196-205.

Gallegos C. O., and Patton J. T.. (1989). Characterization of rotavirus replication intermediates: as a model for assembly of single-shelled particles. *Virology.* 172; 616-27.

Gilger M. A., Matson D. O., Conner M. E., Rosenblatt H. M., Finegold M. J., and Estes M. K.. (1992). Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *J. Pediatr.* 120; 912-17.

Gordon A. G.. (1982). Rotavirus infections and the sompe syndrome. *J. Infect. Dis.* 146; 117-18.

Gorziglia M. I., and Collins P. L.. (1992). Intracellular amplification and expression of a synthetic analog of rotavirus genomic RNA bearing a foreign marker gene: mapping cis-acting nucleotids in the 3' -noncoding region. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89; 5784-88.

Gouvea V., Allen J. R., Glass R. I., *et al.* (1991). Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29 ; 519-23.

Graham D. Y., and Estes M. K.. (1985). Proposed working serologic classification system for rotavirus. *Ann. Inst. Pasteur.* 136; 5-12.

Graham K. L., *et al.* (2003). Integrin-using rotaviruses bind alpha2-beta1 integrin alphaV-beta3 by using VP7 during cell entry. *J. Virol.* 77; 9969-78.

Grimwood K., Abbot G. P., Ferguson D. M., Jennings L. C., and Allan J. M.. (1983). Spread of rotavirus within families: a community based study. *Br. Med. J.* 287; 575-77.

Guerrant R. L., Kirchoff L. V., Schields D. S., *et al.* (1983). Prospective study of diarrheal illnesses in Northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. *J. Infect. Dis.* 148; 986-97.

Guerrero C. A. *et al.* (2000). Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97; 14644-49.

Guerrero C. A. *et al.* (2002). Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J. Virol.* 76; 4096-4102.

Guo C. *et al.* (1999). Ganglioside GM1a on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. *J. Biochem.* 126; 683-88.

Gurwith M., Wenman W., Hinde D., Feltham S., and Greenberg H.. (1981). A prospective study of rotavirus infections in infants and young children. *J. Infect. Dis.* 144; 218-24.

Heimberger-Jones M., and Patton J. T.. (1986). Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA11. *Virology.* 155; 655-65.

Hewish M. J., *et al.* (2000). Integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J. Virol.* 74; 228-36.

Hoshino Y., Wyatt R. G., Greenberg H. B., Flores J., and Kapikian A. Z.. (1984). Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization. *J. Infect. Dis.* 149; 694-702.

Hua J., Chen X., and Patton J. T.. (1994). Deletion mapping of the rotavirus nonstructural protein NS53 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding. *J. Virol.* 68; 3990-4000.

Hua J., and Patton J. T.. (1994). The carboxyl-half of the rotavirus nonstructural protein NS53 (NSP1) is not required for virus replication. *Virology.* 198; 576-76.

Hundely F., Biryawaho B., Gow M., and Desselberger U.. (1985). Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. *Virology*. 143; 88-103.

Hundley F., McIntyre M., Clark B., Beards G., Wood D., Chrystie I., and Desselberger U.. (1987). Heterogeneity of genome rearrangements in rotaviruses isolated from a chronically infected immunodeficient child. *J. Virol.* 61; 3365-72.

Imai M., Akatani K., Ikegami N., and Furuichi Y.. (1983). Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J. Virol.* 47; 125-36.

Jarvis W. R., Middleton P. J., and Gelfand E. W.. (1983). Significance of viral infections in severe combined immunodeficiency disease. *Pediatr. Infect. Dis.* 2; 187-92.

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

Kapanhke R., Rappold W., Desselberger U., and Riesner D.. (1986). The stiffness of dsRNA: hydrodynamic studies on fluorescence-labelled RNA segments of bovine rotavirus. *Nucleic Acids Res.* 14; 3215-28.

Kapikian A. Z.. (1993). Viral gastroenteritis. *J. Am. Med. Assoc.* 269; 627-30.

Kapikian A. Z.. (1994). Jennerian and modified Jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea in infants and young children: an introduction. In: A. Z. Kapikian, ed. *Viral infections of the gastrointestinal tract.*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc., 409-17.

Kapikian A. Z., Cline W. L., Kim H. W., *et al.* (1976). Antigenic relationships among fice reovirus-like (RVL) agents by complement fixation (CF) and development of a new substitute CF antigen for the human RVL agent of infantile gastroenteritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 152; 535-39.

Kapikian A. Z., Greenberg H. B., Kalica A. R., *et al.* (1981). New developments in viral gastroenteritis. In: Holme T, Holmgren J., Merson M., Molby R., eds. *Acute enteric infections in children: new prospects for treatment and prevention. Proceedings of Novel conference 3.* New York: Elsevier/Noth Holland, 9-57.

Kapikian A. Z., Kim H. W., Wyatt R. G., *et al.* (1974). Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic test. *Science.* 185; 1049-53.

Kapikian A. Z., Wyatt R. G., Levine M. M., *et al.* (1983). Oral administration of human rotavirus volunteers: induction of illness and correlates of resistance. *J. infect. Dis.* 147; 95-106.

Kattoura M. D., Clapp L. L., and Patton J. T.. (1992). The rotavirus nonstructural protein, NS35, possesses RNA-binding activity *in vitro* and *in vivo*. *Virology.* 191; 698-708.

Keljo D. J., Kuhn M., and Smith A.. (1988). Acidification of ebdosomes is not important for the entry of rotavirus into the cell. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 7; 257-63.

Keswick B. H., Pickering L. K, Dupont H. L., Woodward W. E.. (1983). Survival and detection of rotaviruses in environmental surfaces in day care centers. *Appl. Environ. Microbiol.* 46; 813-16.

Koopman J. S.. (1978). Diarrhea and school toilet hygiene in Cali, Colombia. *Am. Epidemiol.* 107; 412-20.

Kozak M.. (1981). Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 9; 5233-50.

Labbé M., Charpilienne A, Crawford S. E., Estes M. K., and Cohen J.. (1991). Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *J. Virol.* 65 ; 2946-52.

Laemli U, K.. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-85.

Liu M., Offit P. A., and Estes M. K.. (1988). Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology.* 163; 26-32.

Ludert J. E., Michelangeli F., Gil F., Liprandi F., and Esparza J.. (1987). Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology.* 27; 95-101.

Malherbe H. H., Harwin R., and Ulrich M.. (1963). The cytopathic effect of vervet monkey viruses. *S. Afr. Med. J.* 37; 407-11.

Malherbe H. H., and Strickland-Cholmley M.. (1967). Simian virus SA-11 and the related "O" agent. *Arch. Ges. Virusforsch.* 22; 235-45.

Mansell E. A., and Patton J. T.. (1990). Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *J. Virol.* 64; 4988-96.

Mata L., Simhon A., Urrutia J. J., *et al.* (1983). Epidemiology of rotaviruses in a cohort of 45 Guatemalan Mayan Indian children observed from birth to the age of three years. *J. Infect. Dis.* 148; 452-61.

Mattion N. M, Cohen J., Aponte C., and Estes M. K.. (1992). Characterization of an oligomerization domain of RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NS34. *Virology.* 190; 68-83.

Mattion N. M., Mitchell D. B., Both G. W., and Estes M. K.. (1991). Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology.* 181; 295-304.

McCrae M. A., and McCorquodale J. G. Molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of viral RNA species. *Virology.* 126; 204-12.

McNulty M. S., Curran W. L., and McFerran J. B.. (1976). The morphogenesis of a cytopathic bovine rotavirus in Madin-Darby bovine kidney cells. *J. of Gen. Virol.* 33; 503-08.

Mebus C. A., Underdahl N. R., Rhodes M. B., and Twiehaus M. J.. (1969). Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. *Univ., Nebraska Res. Bull.* 233; 1-16.

Méndez E., Arias C. F., and Lopez S.. (1994). Binding of sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* 67; 5253-59.

Mitchell D. B., and Both G. W.. (1990). Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. *Virology.* 177; 324-31.

Moe K., and Shirley J. A.. (1982). The effect of relative humidity and temperature on the survival of human rotavirus in faeces. *Arch. Virol.* 72; 179-86.

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

Nakagomi O., and Nakagomi T.. (1991). Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus. *Arch. Virol.* 120; 43-55.

Nakagomi O., and Nakagomi T.. (1993). Interspecies transmission of rotaviruses studied from the perspective of genogroup. *Microbiol. Immunol.* 37; 337-48.

Oishi I., Kimura T., *et al.* (1991). Serial observations of chronic rotavirus infection in an immunodeficient child. *Microbiol. Immunol.* 35; 953-61.

Offit P. A., Shaw R. D., and Greenberg H. B.. (1986). Passive protection against rotavirus induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. *J. Virol.* 58; 700-03.

Parashar U. D., Hummelman E. G., Bresee J. S., Miller M. A., and Glass R. I.. (2003). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 565-72.

Patton J. T.. (1986). Synthesis of simian rotavirus SA11 double-stranded RNA in a cell-free system. *Virus Res.* 6; 217-33.

Pedley S., Hundley F., Chrystie I., McCrae M. A., and Desselberger U.. (1984). The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. *J. of Gen. Virol.* 65; 1141-50.

Pesavento J. B., Crawford S. E., Estes M. K., and Prasad B. V.. (2006). Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309; 189-219.

Petrie B. L., Estes M. K., and Graham D. Y.. (1983). Effects of tunicamycin on rotavirus morphogenesis and infectivity. *J. Virol.* 46; 270-74.

Petrie B. L., Graham D. Y., and Estes M. K.. (1981). Identification of rotavirus particle types. *Intervirology.* 16; 20-28.

Petrie B. L., Graham D. Y., Hanssen H., and Estes M. K.. (1982). Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocytochemistry. *J. Gen. Virol.* 63; 457-67.

Petrie B. L., Greenberg H. B., Graham D. Y., and Estes M. K.. (1984). Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Res.* 1; 133-52.

Pickering L. K., Bartlett A. V. ed, Reves R. R., and Morrow A.. (1988). Asymptomatic excretion of rotavirus before and after rotavirus diarrhea in children in day care centers. *J. Pediatr.* 112; 361-65.

Pizzarro D., Posada G., Sandi L., *et al.* (1991). Rice-based oral electrolyte solutions for the management of infantile diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 324; 517-21.

Pocock D. H.. (1987). Isolation and characterization of two group A rotaviruses with unusual genome profiles. *J. of Gen. Virol.* 68; 653-60.

Poncet D., Aponte C., and Cohen J.. (1993). Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNA in infected cells. *J. Virol.* 67; 3159-65.

Poncet D., Laurent S., and Cohen J.. (1994). Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO J.* 13; 4165-73.

Prasad B. V., Wang G. J., Clerx J. P., and Chiu W.. (1988). Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199; 269-75.

Prasad B. V., Burns J. W., Marietta E., Estes M. K., and Chiu W.. (1990). Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature.* 343; 476-79.

Quan C. M., and Doane F. W.. (1983). Ultrastructural evidence for the cellular uptake of rotavirus by endocytosis. *Intervirology.* 20; 223-31.

Ramig R. F.. Isolation and genetic characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11. *Virology.* 120; 93-105.

Redmond M. J., Ijaz M. K., Parker M. D., Sabara M. I., Dent D., Gibbons E., and Babiuk L. A.. (1993). Assembly of recombinant rotavirus proteins into virus-like particles and assessment of vaccine potential. *Vaccine.* 11; 273-81.

Richardson S. C., Mercer S. C., Sonza S., and Holmes I. H.. (1986). Intracellular localization of rotavirus proteins. *Arch. Virol.* 88; 251-64.

Riepenhoff-Talty M., Bogger-Goren S., Li P., Carmody P. J., Barrett H. J., and Ogra P. L.. (1981). Development of serum and intestinal antibody response to rotavirus after naturally acquired rotavirus in man. *J. Med. Virol.* 8; 215-22.

Rodger S. M., and Holmes I. H.. (1979). Comparison of the genomes simian, bovine, and human rotaviruses by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. *J. Virol.* 30; 839-46.

Rodríguez W. J., kim H. W., Arrobio J. O., *et al.* (1977). Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agent in infants and young children. *J. Pediatr.* 91; 188-93.

Rolsma M. D., Gelberg H. B., and kuhlenschmidt M. S.. (1994). Assay for evaluation of rotavirus-cell interactions: identification of an enterocyte ganglioside fraction that mediates group A porcine rotavirus recognition. *J. Virol.* 68; 258-68.

Rolsma M. D., *et al.* (1998). Structure and function of a ganglioside receptor for porcine rotavirus. *J. Virol.* 72; 9079-91.

Ruggeri F. M., and Greenberg H. B.. (1991). Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8* neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. 65; 2211-19.

Sabra M., Barrington A., and Babiuk L. A.. (1985). Immunogenicity of a bovine rotavirus glycoprotein fragment. *J. Virol.* 56; 1037-40.

Saif L. J., Terrett L. A., Miler K. L., and Cross R. F.. (1988). Serial propagation of porcine group C rotavirus (pararotavirus) ina continuous cell line and characterization of the passaged virus. *J. Clin. Microbiol.* 26; 1277-82.

Samadi A. R., Huq M. H., and Ahmed Q. S.. (1983). Detection of rotavirus is hand-washings of attendants of children with diarrhea. *Br. Med. J.* 286; 188.

Sanekata T., and Okada H.. (1983). Human rotavirus detection by agglutination of antibody-coated erythrocytes. *J. Clin. Microbiol.* 17; 1141-7.

Saulsbury F. T., Einkelstein J. A., and Yolken R. H.. (1980). Chronic rotavirus infection in immunodeficiency. *J. Pediatr.* 97; 61-5.

Shahrabadi M. S., and Lee P. W.. (1986). Bovine rotavirus maturation is a calcium-dependent process. *Virology.* 152; 298-307.

Shinozaki K., Yamanaka T., Tokieda M., Shirasawa H., and Simizu B.. (1996). Isolation and serial propagation of human group C rotaviruses in a cell line (CaCo-2). *J. Med. Virol.* 48; 48-52.

Smith E. M., and Gerba C. P.. (1982). Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 43; 1440-50.

Snodgrass D. R., and Herring J. A.. (1977). The action of disinfectants on lamb rotavirus. *Vet. Rec.* 101; 81.

Spencer E., and Arias M. L.. (1981). In vitro transcription catalyzed by heat-treated human rotavirus. *J. Virol.* 40; 1-10.

Srnka C. A., Tiemeyer M., Gilbert J. H., and et al.. (1992). Cell surface ligands for rotavirus: mouse intestinal glycolipids and synthetic carbohydrate analogs. *Virology.* 190; 794-805.

Stacy-Phipps S., and Patton J. T.. (1987). Synthesis of plus- and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *J. Virol.* 61; 3479-84.

Su C., Wu Y., Shen H., et al.. (1986). An outbreak of epidemic diarrhoea in adults caused by a new rotavirus in Anhui province of China in the summer of 1983. *J. Me. Virol.* 19; 167-73.

Suzuki H., Kitaoka S., Sato T., et al..(1986). Further investigation of the model of entry of human rotavirus into cells. *Arch. Virol.* 91; 135-44.

Svensson L., Dormitzer P. R., von Bonsdorff C., Mannula L., and Greenberg H. B.. (1994). Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly. *J. Virol.* 68; 5204-15.

Tallet S., MacKenzie C., Middelton P., Kernzer B., and Hamilton R.. (1977). Clinical, laboratory and epidemiological features of viral gastroenteritis in infants and children. *Pediatrics.* 60;217-22.

Tan J. A.; and Schnagl R. G.. (1981). Inactivation of rotavirus by disinfectants. *Med. J. Aust.* 1; 19-23.

Tanaka T. K., Conner M. E., Graham D. Y., and Estes M. K.. (1988). Molecular characterization of three rabbit rotavirus strains. *Arch. Virol.* 98; 253-65.

Vaughn J. M., Chen Y.-S., Thomas M. Z.. (1986). Inactivation of human and simian rotavirus by chlrne. *Appl. Environ. Microbiol.* 51; 391-94.

Vollet J. J. III, DuPont H. L., and Pickering L. K.. (1981). Nonenteric sources of rotavirus in acute diarrhea. *J. Infec. Dis.* 144; 495.

Ward R. L., Bernstein D. I., Young E. C., Sherwood J. R., Knowlton D. R., and Schiff G. M.. (1991). Reactivities of serotyping monoclonal antibodies with culture-adapted human rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 29; 449-56.

Welch S. K., Crawford S. E., and Estes M. K.. (1989). Rotavirus SA11 genome segment 11 protein is a nonstructural phosphoprotein. *J. Virol.* 63; 3974-82.

Welter M. W., Welter E., and Skordeles C.. (1991). Adaptation and serial passage of porcine group C rotavirus in ST-cells, an establish diploid swine testicular cell line. *Arch. Virol.* 120; 297-304.

Wilde J., Van R., Pickering L., Eiden J., and Yolken R. H.. (1992). Detection of rotaviruses in the day care environment by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Infec. Dis.* 166; 507-11.

Wilde J., Yolken R., Willoughby R., and Eiden J.. (1991). Improved detection of rotavirus shedding by polymerase chain reaction. *Lancet.* 337/8737; 323-26.

Willoughby R. E., Yolken R. H., Schnaar R. L.. (1990). Rotaviruses specifically bind to the neutral glycosphingolipid asialo-GM1. *J. Virol.* 64; 4830-35.

Wood D. J., David T. J., Chrystie I .L., and Totterdell B.. (1988). Chronic enteric virus infection in two T-cell immunodeficient children. *J. Med. Virol.* 24; 435-44.

Xu L., Harbour D., and McCrae M. A.. (1990). The application of polymerase chain reaction to the detection of rotaviruses in faeces. *J. Virol. Methods.* 27; 29-38.

Yeager M., Dryden K. A., Olson N. H., Greenber H. B., and Beaker T. S.: (1990). Three dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J. Cell Biology.* 110; 2133-44.

Yolken R. H., Willoughby R., Wee S. B., Miskuff R., and Vonderfecht S.. (1987). Sialic acid glycoproteins inhibit *in vitro* and *in vivo* replication of rotaviruses. *J. Clin. Invest.* 79; 148-54.

Yolken R. H., Wee S. B., Eiden J., Kinney J., and Vonderfecht S.. (1988). Identification of a group-reactive epitope of group B rotaviruses recognized by monoclonal antibody and application to the development of a sensitive immunoassay for viral characterization. *J. Clin. Microbiol.* 26; 1853-58.

Yolken R. H., and Wilde J. A.. (1994). Assays for detecting human rotavirus. In: A. Z: Kapikian, ed. *Viral Infections of the gastrointestinal tract.* New York: Marcel Dekker, Inc., 251-78.

Yow M. D., Melnick J. L., Blattner R. J., Stephenson W. B., Robinson N. M., and Burkhardt M. A.. (1970). The association of viruses and bacteria with infantile diarrhea. *Am. Epidemiol.* 92; 33-9.

Zárate S., Espinoza R., Romero P., Mendez E., Arias C. F., and López S. 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J. Virol.* 74; 593-99.

Zeng B. J., Ma G. Z., Tam J. S. L., Lo S. K. F., Hon M., Lam B. C. C., and Yeung C. Y.. (1991). The effects of maternal antibodies on neonatal rotavirus infection. *Pediatr. Infect. Dis.* 10; 865-68.

Zeng Q., Labbé M., Cohen J., Prasad B. V. V., Chen D., Ramig R. F., and Estes M. K.. (1994). Characterization of rotavirus VP2 particles. *Virology.* 201; 55-65.

APÉNDICE

Apéndice A

Secuencias nucleotídica y aminoacídica de NSP2-SA11 clonada en el plásmido vector pVOTE1, la cual tiene un 100 % de homología con la secuencia previamente reportada al GeneBank: J02353.

```
ATGGCTGAGCTAGCTTGCTTTTGTATCCCCATTTGGAGAACGATAGCTATAGATTTATT
METAlaGluLeuAlaCysPheCysTyrProHisLeuGluAsnAspSerTyrArgPheIle
CCATTTAACAGTTTACCTATAAAGTGTATGTTGACAGCAAAAGTGCACAAAAAGATCAA
ProPheAsnSerLeuAlaIleLysCysMETLeuThrAlaLysValAspLysLysAspGln
GATAAATTTTACAACCTCGATAATTTATGGTATTGCACCACCGCCACAATTCAAAAAACGT
AspLysPheTyrAsnSerIleIleTyrGlyIleAlaProProProGlnPheLysLysArg
TACAACACCGAGTGATAATTC AAGAGGAATGAACTATGAACTTCAATGTTTAATAAAGTG
TyrAsnThrSerAspAsnSerArgGlyMETAsnTyrGluThrSerMETPheAsnLysVal
GCGGCGTTAATTTGTGAAGCACTGAATTC AATTAAAGTTACTCAATCTGATGTTGCAAGT
AlaAlaLeuIleCysGluAlaLeuAsnSerIleLysValThrGlnSerAspValAlaSer
GTACTTTCAAAAAATAGTTTCTGTAAGGCATTTAGAGAACTTGCTGCTAAGAAGACAGAAT
ValLeuSerLysIleValSerValArgHisLeuGluAsnLeuValLeuArgArgGluAsn
CATCAGGACGTGCTATTCCATTCAAAAAGAGTTGTTACTGAAATCAGTACTAATAGCTATT
HisGlnAspValLeuPheHisSerLysGluLeuLeuLysSerValLeuIleAlaIle
GGTCATTCAAAAAGAAATCGAGACAACTGCCACTGCTGAAGGAGGGGAAATTGTTTTTCAA
GlyHisSerLysGluIleGluThrThrAlaThrAlaGluGlyGlyGluIleValPheGln
AATGCAGCTTTTACAATGTGGAAATGACATACCTGGAACATAAACTAATGCCAATTTTG|
AsnAlaAlaPheThrMETTrpLysLeuThrTyrLeuGluHisLysLeuMETProIleLeu
GATCAAAAATTTTATTGAATATAAAAATAACACTGAATGAAGATAAAACCAATTTTCAGACTCA
AspGlnAsnPheIleGluTyrLysIleThrLeuAsnGluAspLysProIleSerGluSer
CATGTCAAAGAGCTCATTGCTGAACTGCGGTGGCAATACAATAAATTTGCAGTAATTACA
HisValLysGluLeuIleAlaGluLeuArgTrpGlnTyrAsnLysPheAlaValIleThr
CATGGTAAAGGTCACTACAGAGTTGTAAAATATTCATCAGTTGCCAATCATGCAGATAGA
HisGlyLysGlyHisTyrArgValValLysTyrSerSerValAlaAsnHisAlaAspArg
GTTTACGCTACTTTTCAAGAGCAAAAAATAAAAATGGAAATATGATAGAATTTAATCTACTT
ValTyrAlaThrPheLysSerLysAsnLysAsnGlyAsnMETIleGluPheAsnLeuLeu
GATCAAAAGAATAATATGCCAGAATTGCTATGCGTTTACGTCCTCAATGAAACAAGGCAAT
AspGlnArgIleIleTrpGlnAsnTrpTyrAlaPheThrSerSerMETLysGlnGlyAsn
ACTCTTGAAATATGTAAGAAGCTACTGTTCCAGAAGATGAAGCGAGAAAGCAATCCGTTT
ThrLeuGluIleCysLysLysLeuLeuPheGlnLysMETLysArgGluSerAsnProPhe
AAGGGCGTCAACTGATAGAAAGATCGATGAAGTTTCTCAAAATACGAATTTAA
LysGlyLeuSerThrAspArgLysMETAspGluValSerGlnIleGlyIle***
```

Apéndice B

Secuencias nucleotídica y aminoacídica de NSP2 de rotavirus de simio SA11 con número de acceso al GeneBank: J02353.

ATGGCTGAGCTAGCTTGCTTTTGTATCC
METAlaGluLeuAlaCysPheCysTyrPro

CCATTTGGAGAACGATAGCTATAGATTTATTCCATTTAACAGTTTAGCTATAAAGTGTATGTTGACAGCAAAAGT
HisLeuGluAsnAspSerTyrArgPheIleProPheAsnSerLeuAlaIleLysCysMETLeuThrAlaLysVal

GGACAAAAAGATCAAGATAAATTTTACAACCTCGATAATTTATGGTATTGCACCACCGCCACAATTCAAAAAACG
AspLysLysAspGlnAspLysPheTyrAsnSerIleIleTyrGlyIleAlaProProProGlnPheLysLysArg

TTACAACACGAGTGAATAATCAAGAGGAATGAACTATGAACTTCAATGTTAATAAAGTGGCGCGGTTAATTTG
TyrAsnThrSerAspAsnSerArgGlyMETAsnTyrGluThrSerMETPheAsnLysValAlaAlaLeuIleCys

TGAAGCACTGAATTCAATTAAGTTACTCAATCTGATGTTGCAAGTGTACTTTCAAAAATAGTTTCTGTAAGCCA
GluAlaLeuAsnSerIleLysValThrGlnSerAspValAlaSerValLeuSerLysIleValSerValArgHis

TTTAGAGAACTTGCTGCTAAGAAGAGAGAATCATCAGGACGTGCTATTCCATTCAAAAAGAGTTGTTACTGAAATC
LeuGluAsnLeuValLeuArgArgGluAsnHisGlnAspValLeuPheHisSerLysGluLeuLeuLysSer

AGTACTAATAGCTATTGGTCATTCAAAAAGAAATCGAGACAACCTGCCACTGCTGAAGGAGGGGAAAATTGTTTTCA
ValLeuIleAlaIleGlyHisSerLysGluIleGluThrThrAlaThrAlaGluGlyGlyGluIleValPheGln

AAATGCAGCTTTTACAATGTGAAAATTGACATACCTGGAACATAAACTAATGCCAATTTTGGATCAAAAATTTTAT
AsnAlaAlaPheThrMETTrpLysLeuThrTyrLeuGluHisLysLeuMETProIleLeuAspGlnAsnPheIle

TGAATATAAAATAACACTGAATGAAGATAAACCAATTTTACAGACTCACACGTCAAAGAGCTCATTGCTGAACTGCG
GluTyrLysIleThrLeuAsnGluAspLysProIleSerGluSerHisValLysGluLeuIleAlaGluLeuArg

GTGCCAATACAATAAATTTGCAGTAATTACACATGGTAAAGGTCACACTACAGACTTGTAATAATTCATCAGTTGC
TrpGlnTyrAsnLysPheAlaValIleThrHisGlyLysGlyHisTyrArgValValLysTyrSerSerValAla

GAATCATGCAGATAGAGTTTACGCTACTTTCAAGAGCAATAATAAAAAATGGAATATGATAGAATTTAATCTACT
AsnHisAlaAspArgValTyrAlaThrPheLysSerAsnAsnLysAsnGlyAsnMETIleGluPheAsnLeuLeu

TGATCAAAGAATAATATGCCAGAATTGGTATGCGTTTACGTCCTCAATGAAACAAGGCAATACTCTTGAAATATG
AspGlnArgIleIleTrpGlnAsnTrpTyrAlaPheThrSerSerMETLysGlnGlyAsnThrLeuGluIleCys

TAAACAAGCTACTGTTCCAGAAGATGAAGCCGAGAAAGCAATCCGTTTAAAGGGCTGTCAACTGATAGAAACATGGA
LysLysLeuLeuPheGlnLysMETLysArgGluSerAsnProPheLysGlyLeuSerThrAspArgLysMETAsp

TGAAGTTTCTCAAATAGGAATTTAA
GluValSerGlnIleGlyIle***

Apéndice C

Secuencias nucleotídica y aminoacídica de NSP5-SA11 clonada en el plásmido vector pVOTE1, la cual tiene un 100 % de homología con la secuencia previamente reportada al GeneBank: M28347, excepto que se modificó el segundo aminoácido de Serina por una Alanina con la intención de obtener una secuencia Kozak para una iniciación fuerte de la traducción.

```
ATGGCTCTCAGTATTGACGTGACGAGTCTTCCTTCTATTTCCTTCAACTATATATAAGAAT
METAlaLeuSerIleAspValThrSerLeuProSerIleProSerThrIleTyrLysAsn
GAATCGTCTTCAACAACGTCAACTCTTTCTGGAAAATCTATTGGTAGGAGTGAACAGTAC
GluSerSerSerThrThrSerThrLeuSerGlyLysSerIleGlyArgSerGluGlnTyr
ATTCACCAGATGCAGAAGCATTCAATAAATACATGCTGTGCGAAGTCTCCAGAGGATATT
IleSerProAspAlaGluAlaPheAsnLysTyrMETLeuSerLysSerProGluAspIle
GGACCATCTGATTCTGCTTCAAACGATCCACTCACCAGTTTTTCGATTAGATCGAATGCA
GlyProSerAspSerAlaSerAsnAspProLeuThrSerPheSerIleArgSerAsnAla
GTTAAGACAAATGCAGACGCTGGCGTGTCTATGGATTCATCAGCACAAATCACGACCTTCA
ValLysThrAsnAlaAspAlaGlyValSerMETAspSerSerAlaGlnSerArgProSer
AGTAATGTCGGATGCGATCAAGTGGATTTCTCCTTAAATAAAGGCTTAAAAGTAAAAGCT
SerAsnValGlyCysAspGlnValAspPheSerLeuAsnLysGlyLeuLysValLysAla
AATTTGGACTCATCAATATCAATATCTACGGATACTAAAAAGGAGAAATCAAAACAAAAC
AsnLeuAspSerSerIleSerIleSerThrAspThrLysLysGluLysSerLysGlnAsn
CATAAAAGTAGGAAGCACTACCCAAGAATTGAAGCAGAGTCTGATTCAGATGATTATGTA
HisLysSerArgLysHisTyrProArgIleGluAlaGluSerAspSerAspAspTyrVal
CTGGATGATTGAGATAGTGATGATGCTAAATGTAAGAACTGTAATATAAGAAGAAATAC
LeuAspAspSerAspSerAspAspGlyLysCysLysAsnCysLysTyrLysLysLysTyr
TTCGCATTAAGAATGAGAATGAAACAAGTCGCAATGCAATTGATTGAAGATTTGTAA
PheAlaLeuArgMETArgMETLysGlnValAlaMETGlnLeuIleGluAspLeu***
```

Apéndice D

Secuencias nucleotídica y aminoacídica de NSP5 de rotavirus de simio SA11 con número de acceso al GeneBank: M28347.

ATGTCTCTCAGTATTGACGTGACGAGTCTTCCTTCTATTTCCTTCAACTATATATAAGAAT
METSerLeuSerIleÀspValThrSerLeuProSerIleProSerThrIleTyrLysÀsn

GAATCGTCTTCAACAACGTCAACTCTTTCTGGAAAATCTATTGGTAGGAGTGAACAGTAC
GluSerSerSerThrThrSerThrLeuSerGlyLysSerIleGlyÀrgSerGluGlnTyr

ATTTACCAGATGCAGAAGCATTCAATAAATACATGCTGTCTCGAAGTCTCCAGAGGATATT
IleSerProÀspÀlaGluÀlaPheÀsnLysTyrMETLeuSerLysSerProGluÀspIle

GGACCATCTGATTCTGCTTCAAACGATCCACTCACCAGTTTTTCGATTAGATCGAATGCA
GlyProSerÀspSerÀlaSerÀsnÀspProLeuThrSerPheSerIleÀrgSerÀsnÀla

GTTAAGACAAAATGCAGACGCTGGCGTGTCTATGGATTCATCAGCACAATCACGACCTTCA
ValLysThrÀsnÀlaÀspÀlaGlyValSerMETÀspSerSerÀlaGlnSerÀrgProSer

AGTAATGTCGGATGCGATCAAGTGGATTTCTCCTTAAATAAAGGCTTAAAAGTAAAAGCT
SerÀsnValGlyCysÀspGlnValÀspPheSerLeuÀsnLysGlyLeuLysValLysÀla

AATTTGGACTCATCAATATCAATATCTACGGATACTAAAAAGGAGAAATCAAAACAAAAC
ÀsnLeuÀspSerSerIleSerIleSerThrÀspThrLysLysGluLysSerLysGlnÀsn

CATAAAAGTAGGAAGCACTACCCAAGAATTGAAGCAGAGTCTGATTCAGATGATTATGTA
HisLysSerÀrgLysHisTyrProÀrgIleGluÀlaGluSerÀspSerÀspÀspTyrVal

CTGGATGATTCAGATAGTGATGATGCTAAATGTAAGAACTGTAATATAAGAAGAAATAC
LeuÀspÀspSerÀspSerÀspÀspGlyLysCysLysÀsnCysLysTyrLysLysLysTyr

TTCCGATTAAGAATGAGAATGAAACAAGTCGCAATGCAATTGATTGAAGATTTGTAA
PheÀlaLeuÀrgMETÀrgMETLysGlnValÀlaMETGlnLeuIleGluÀspLeu***