



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

IDENTIFICACION DE LOS GENES DE ROTAVIRUS
INVOLUCRADOS EN EL APAGADO DE LA
SINTESIS DE PROTEINAS CELULARES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

**Biol. MARCO ANTONIO ESPINOZA
TORRES**

Director de tesis: Dra. Susana López Charretón

Cuernavaca Mor. 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Susana López Charretón. Durante la realización de este trabajo se contó con una beca otorgada por CONACYT

DEDICATORIA

A todas las personas que han contribuido de manera significativa en mi vida, por sus enseñanzas, por su cariño y porque siempre han estado conmigo cuando las he necesitado.

A mis padres, Juan y Eufrosina, por nunca rendirse y siempre tratar de hacer de mí una mejor persona, por su amor, sus consejos, sus enseñanzas y apoyo incondicional. Su carácter y su ejemplo han sido un motor en mi vida, todo lo que soy se lo debo a ustedes.

A mis hermanos Juan, Eder y Martin, porque he aprendido mucho a través de ustedes, por sus consejos, su apoyo en tantos momentos difíciles, su cariño y sobre todo por su ejemplo.

A mi novia Laura, por su amor durante todos estos años, sus consejos, por brindarme palabras de apoyo y aliento y por estar conmigo siempre. Por tantos momentos que solo a tu lado han sido posibles.

A Doña Guille, por abrirme las puertas de su casa, sus buenos deseos y su apoyo.

A Rufina, Araceli, Grecia, Mariana, Gael y Daira, por sus buenos deseos, su apoyo y porque son parte importante de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellos que contribuyeron a mi formación académica y me brindaron su apoyo cuando lo necesite.

A la Dra. Susana López por brindarme la oportunidad de formar parte del grupo Arias/López, por su paciencia y su ayuda en mi formación académica.

A Rafaela Espinosa Organista por su apoyo y muy importante contribución para la realización de este trabajo. Por todas sus enseñanzas tanto en el aspecto académico como en el ámbito personal, por todo el tiempo dedicado, por sus valiosos consejos y por su amistad.

A Pedro Romero por su valiosa ayuda en mi formación académica, su compañerismo y por hacer más amena mi estancia en el laboratorio Arias/López.

A los miembros del grupo Arias/López por hacer agradable mi estancia en el laboratorio.

A aquellos que con sus críticas y consejos hicieron de éste un mejor trabajo.

Comité tutorial:

Dra. Susana López Charretón

Dr. José Luis Reyes

Dr. Ramón Antonio González García-Conde

Jurado de examen:

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera

Dr. José Luis Puente García

Dr. Celso Ramos García

Dra. María de Lourdes Gonzales Xicotencatl

Dra. Susana López Charretón

INDICE GENERAL

	Página
Índice General	5
Abreviaturas	7
Índice de figuras	9
Índice de tablas	10
Resumen	11
Introducción	12
Traducción de proteínas celulares y regulación	12
Regulación traduccional mediada por virus	15
Los rotavirus	
Generalidades	16
Estructura y genoma	17
Ciclo replicativo de los rotavirus	19
Rearreglos genéticos en los rotavirus	21
Antecedentes	23
Hipótesis	27
Objetivo	27
Objetivos particulares	27
Materiales y métodos	28
Resultados y Discusión	
Generación y caracterización de los rearreglantes	35
Curva de crecimiento de los rotavirus YM y RRV	46
Liberación de LDH durante la infección	48
Análisis del fenotipo de apagado de la síntesis de proteína celular	52

Síntesis de proteínas en células infectadas con los rearreglantes	53
Fosforilación del factor eIF2 durante la infección con rotavirus	56
Conclusiones	61
Perspectivas	62
Referencias	63

ABREVIATURAS

4E-BPs: Proteínas de unión a eIF4E (eIF4E Binding Proteins)

DLP: Partícula viral de doble capa (Double-Layered Particle)

eIF2: Factor de inicio eucariótico 2

eIF2 α : Factor de inicio eucariótico 2, subunidad alfa

eIF2 α^P : Factor de inicio eucariótico 2, fosforilado en la subunidad alfa

H1N1: Virus de Influenza Hemaglutinina 1, Neuraminidasa 1

Hpi: Horas post-infección

IRES: Sitio interno de entrada al ribosoma (Internal Ribosome Entry Site)

IRF3, 5, 7: Factores de respuesta a Interferón 3, 5, 7 (Interferon response factors)

LDH: Lactato deshidrogenasa

m⁷G: 7-Metil guanosina

MA104: Células de riñón de mono

MEM: Medio esencial mínimo

Met-tRNA: RNA de transferencia cargado con metionina

MOI: Multiplicidad de infección (partículas virales por célula)

mRNA: RNA mensajero

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido

NCDV: Rotavirus bovino, cepa NCDV

PABP: Proteína de unión al poli(A) (Poli-A Binding Protein)

PCR: Reacción en cadena de la DNA-polimerasa

RE: Retículo endoplasmico

RF: Rotavirus bovino, cepa UK

RNA: Acido Ribonucleico

RNA_{dc}: RNA de doble cadena

RRV: Rotavirus de simio, cepa RRV

S³⁵: Metionina con isótopo radiactivo de azufre

SA11: Rotavirus de simio, cepa SA11

SiRNA: RNA pequeño interferente

TLP: Particula viral de triple capa (Triple-Layered Particle)

tRNA: RNA de transferencia

UK: Rotavirus bovino, cepa UK

WC3: Rotavirus bovino, cepa UK

Y/R: Mezcla de RNA de los rotavirus YM y RRV

YM: Rotavirus porcino, cepa YM

INDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1- Inicio de la traducción de los mRNAs celulares.	13
Fig. 2- Ciclo de eIF2 y regulación por diversas cinasas.	14
Fig. 3- Rotavirus, Criomicroscopía electrónica de la partícula viral, genoma y proteínas del virus.	18
Fig. 4- Ciclo replicativo de los Rotavirus.	19
Fig. 5- Representación esquemática de un posible rearrreglo en los rotavirus.	21
Fig. 6- Marcaje metabólico de proteínas con S^{35} y western blot del factor eIF2 total o fosforilado en células MA104 infectadas con diferentes cepas de rotavirus.	26
Fig. 7- Geles de poliacrilamida-SDS al 10% con rearrreglantes seleccionados.	35
Fig. 8- Productos de amplificación por RT-PCR de los genes 10 y 8 de algunos rearrreglantes.	36
Fig. 9- Digestiones del producto de PCR del gen 10, Corte con enzimas de restricción a) Accl y b) BamHI.	38
Fig. 10- Digestiones del producto de PCR del gen 7, corte con enzimas de restricción a) XbaI y b) Hind III.	38
Fig. 11- Autorradiografía de la electroforesis de lisados de células infectadas con cepas rearrreglantes.	40
Fig. 12- Corte del producto de PCR del gen 9 con la enzima Tth111I.	41
Fig. 13- Titulo de virus intracelular obtenido en células infectadas con YM o RRV y cosechados a los tiempos post-infección indicados.	47
Fig. 14- Porcentaje de LDH liberado al medio durante la infección con rotavirus YM o RRV a distintos tiempos post-infección.	48
Fig. 15- Análisis de regresión no lineal de LDH liberado al medio durante la infección con YM y RRV.	49
Fig. 16- Marcaje metabólico de células infectadas con YM o RRV y proteínas teñidas con azul de coomassie.	52
Fig. 17- Densitometria de proteínas celulares sintetizadas durante la infección con los rotavirus YM y RRV.	53
Fig. 18- Western blot contra eIF2 durante la infección por rotavirus a diferentes horas post-infección.	56
Fig. 19- Estado de fosforilación del factor eIF2 durante la infección por rotavirus a 8 Hpi.	57

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Enzimas de restricción y pesos esperados con cada gen parental YM y RRV.	37
Tabla 2. Origen parental de los segmentos génicos de cada rearreglante (primera co-infección).	39
Tabla 3. Rearreglantes seleccionados durante la segunda co-infección.	42
Tabla 4. Relación de segmentos génicos derivados de RRV en los virus rearreglantes.	43
Tabla 5. Clonas utilizadas para la caracterización de fenotipos y genes con rearreglo.	46
Tabla 6. Resumen de rearreglantes y tendencia de liberación de LDH al medio.	50
Tabla 7. Resumen de rearreglantes y fenotipo del apagado de la síntesis de proteínas celulares.	54
Tabla 8. Resumen de rearreglantes, tendencia a la liberación de LDH al medio, fenotipo del apagado de la síntesis de proteínas celulares y fosforilación del factor eIF2.	58

RESUMEN

La inhibición de la síntesis de proteínas celulares (shut off) de la célula hospedera es un proceso en el cual la síntesis de proteínas celulares es severamente inhibida debido al control viral durante una infección. El apagado de la síntesis celular es ventajoso para los virus, ya que les permite disponer de recursos celulares, incluyendo la maquinaria para la traducción de sus proteínas. Sin embargo, el virus debe contender contra mecanismos celulares que responden específicamente a este shut off celular y generar mecanismos para: a) evitar los programas apoptóticos celulares y b) controlar la respuesta traduccional antiviral impuesta principalmente mediante la fosforilación del factor eIF2 α .

Se ha observado que durante el ciclo replicativo de rotavirus ocurre la fosforilación de eIF2 α , de manera que se ha propuesto que el apagado en la síntesis de proteínas celulares puede deberse a dos factores: 1) la interacción de la proteína no estructural NSP3 con el factor celular eIF4G, evitando que PABP se una a este y que la traducción de proteínas celulares no se lleve a cabo y 2) la fosforilación del factor eIF2 α que evita la formación del complejo ternario con lo cual se evita la formación de complejos de inicio de la traducción de proteínas. En nuestro laboratorio se encontró que el grado en el que rotavirus apaga la síntesis celular y el grado de fosforilación del factor eIF2 varía dependiendo de la cepa de rotavirus que se utilice. Dos cepas de rotavirus, la cepa porcina YM y la cepa de simio RRV presentan características fenotípicas notables en cuanto al modo en que apagan la síntesis de proteínas celulares y el grado de fosforilación del factor eIF2.

En el caso de la infección con rotavirus YM se observó una menor fosforilación del factor eIF2 α con respecto a la presentada por RRV y aún así la inhibición de la síntesis celular es más severa en células infectadas con YM. Para determinar cuál o cuáles segmentos genéticos están relacionados con características fenotípicas específicas de apagado de la síntesis de proteínas celulares y la fosforilación del factor eIF2 α se generaron rearreglantes entre las cepas de rotavirus YM y RRV mediante co-infecciones en células MA104. En este estudio se observó que ciertos rearreglos genéticos favorecen la modificación de los fenotipos analizados de apagado de la síntesis de proteínas celulares, de liberación de LDH y de fosforilación del factor eIF2, principalmente aquellos rearreglos que se dan entre las proteínas estructurales del rotavirus, codificados por los genes 1, 2, 3, 6 y 9 cuando estos co-segregan juntos o en el caso de VP3 cuando segrega de manera independiente. Esto podría ser explicado en parte a la gran interacción entre ellas, se sabe que estas interacciones son críticas para los procesos de replicación y transcripción del genoma de los rotavirus. No obstante, son necesarios más estudios para determinar específicamente, cual gen es el responsable de estos fenotipos o si se necesita la co-segregación de estos genes en particular y posteriormente estudiar el mecanismo por el que estas proteínas favorecen el apagado de la síntesis de proteínas celulares.

INTRODUCCION

Como parásitos intracelulares obligados, los virus utilizan la maquinaria celular para su replicación y propagación a otras células. Mientras que algunos virus codifican o llevan la maquinaria necesaria para la replicación o transcripción de su genoma, otros usan la maquinaria del hospedero. En contraste, ningún virus tiene la maquinaria necesaria para la traducción de sus mRNAs y en consecuencia, la síntesis de proteínas virales es completamente dependiente de la maquinaria traduccional de la célula hospedera. No es sorprendente, por lo tanto, que los virus hayan desarrollado diversas estrategias para re-direccionar la maquinaria biosintética de la célula a favor de la traducción de las proteínas virales, mientras que inhiben la síntesis de proteínas celulares.

TRADUCCION DE PROTEINAS CELULARES Y REGULACION

La síntesis de proteínas celulares es un proceso complejo que como primer paso involucra la unión del tRNA-metionina a la subunidad ribosomal 40S. Este paso es facilitado por la formación del complejo ternario eIF2-GTP-Met-tRNA. La formación de este complejo ternario facilita la unión del tRNA-metionina al sitio P del ribosoma durante el inicio de la traducción. El complejo ternario se une a la subunidad ribosomal 40S para formar un complejo 43S que incluye además a eIF3, siendo este último el encargado de facilitar la unión al mRNA vía el complejo de unión al CAP, eIF4F, que ha sido previamente ensamblado alrededor de la estructura m⁷G del CAP (fig. 1). La formación del complejo eIF4F es dependiente de eIF4E, el cual reconoce y se une específicamente al CAP en el extremo 5' del mRNA. Una vez que el complejo eIF4F ha sido ensamblado alrededor del CAP éste se asocia al complejo 43S y se genera el complejo 48S, el cual se desplaza en el mRNA hasta encontrar el codón de inicio, entonces, eIF5 favorece la hidrólisis del GTP del complejo ternario lo que promueve a su vez la inserción del tRNA-metionina y la liberación de los factores de inicio, así como la unión de la subunidad ribosomal 60S para iniciar la traducción del mRNA^{8,31}. El factor intercambiador de nucleótidos de guanina, eIF2B, es el encargado de realizar el intercambio de eIF2-GDP por eIF2-GTP, asegurando así una nueva ronda de inicio de la traducción³¹ (Fig. 1).

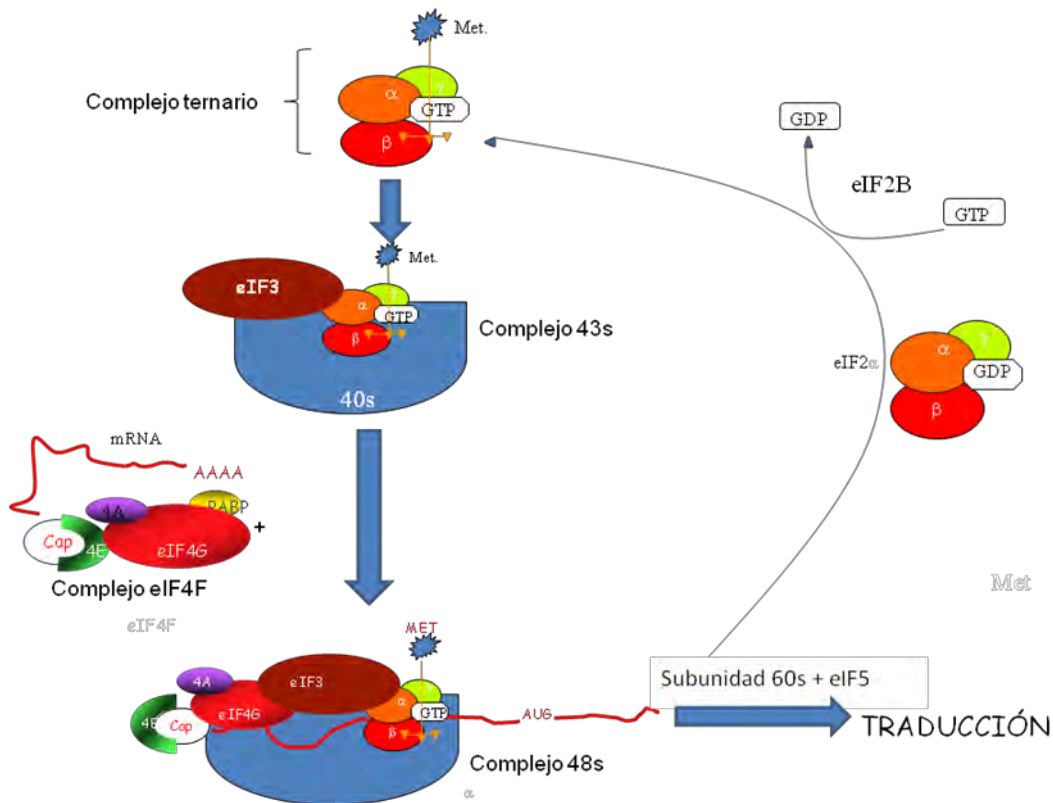


Fig. 1- Inicio de la traducción de los mRNAs celulares⁸.

La regulación traduccional ofrece una rápida respuesta a cambios en las condiciones fisiológicas. Esta regulación es principalmente mediante eventos de fosforilación y defosforilación de factores clave para el inicio de la traducción como lo son el factor eIF2 y la proteína eIF4E.

Un mecanismo para la regulación traduccional es impuesto mediante la fosforilación de la proteína de unión al CAP, eIF4E, por la cinasa asociada a eIF4G denominada Mnk1. Esta fosforilación reduce la afinidad de eIF4E por la estructura m⁷G del CAP ubicada en el extremo 5' de los mRNA celulares. Un segundo punto de control es impuesto mediante una familia de pequeñas proteínas que se unen al factor eIF4E, denominadas 4E-BP's. La acumulación de formas hipofosforiladas de las 4E-BPs parece ser un evento importante para la regulación de la traducción de los mRNAs celulares, presumiblemente mediante el secuestro de eIF4E, inhabilitando su unión con eIF4G y, por consiguiente, la formación del complejo de inicio de traducción eIF4F^{6, 22, 38}.

La capacidad que tiene la célula para responder a numerosos tipos de estrés que van desde la falta de nutrientes, estimulación mitogénica, estrés por calor o frío, regulación del ciclo celular, infecciones virales, etc. involucra en parte, su habilidad para regular la actividad de eIF2,

un factor crítico para el inicio de la traducción. eIF2 es un heterotrímero formado por 3 diferentes subunidades llamadas α , β y γ . En condiciones de estrés, la subunidad α es fosforilada en la serina 51 por cuatro diferentes cinasas celulares que responden a condiciones específicas. Estas cinasas son: la cinasa regulada por hemo **HRI** (Heme Regulated-Inhibitor), la cinasa que se activa en presencia de RNAdc **PKR** (Protein Kinase RNA), la cinasa activada en condiciones de estrés en el retículo endoplásmico **PERK** (PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase) y la cinasa activada en respuesta a falta de nutrientes **GCN2** (General Control Nonderepressible 2 kinase). La cinasa PKR es la encargada de fosforilar al factor eIF2 en presencia de infecciones virales, ya que se activa ante la presencia de RNA de doble cadena o RNA altamente estructurado en el citoplasma celular como producto de la replicación viral³¹. Cuando el factor eIF2 se encuentra fosforilado en su subunidad α , se estabiliza la asociación entre eIF2 y el intercambiador de nucleótidos de guanina, eIF2B, impidiendo el intercambio de GDP por GTP necesario para la formación del complejo ternario e inactivando a eIF2 α . Dado que el factor eIF2B se encuentra en cantidades limitantes en la célula, pequeños cambios en la fosforilación e inactivación de eIF2 ejercen grandes efectos sobre la velocidad de traducción⁸ (Fig. 2)

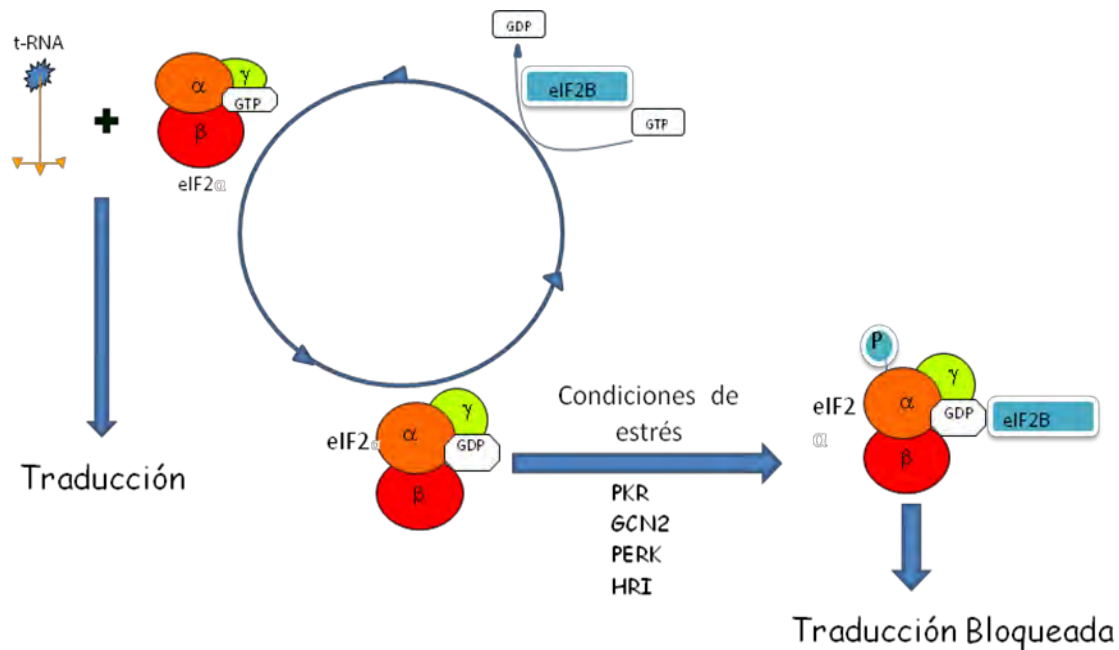


Fig. 2- Ciclo de eIF2 y regulación por diversas cinasas³¹.

REGULACION TRADUCCIONAL MEDIADA POR VIRUS

Los virus han desarrollado diversas estrategias para evadir estos mecanismos de regulación, permitiendo que los complejos traduccionales estén disponibles para la síntesis de sus proteínas. Algunos virus inhiben la síntesis de proteínas celulares mediante la inactivación de uno o más componentes del complejo de inicio de la traducción. Los picornavirus, tales como los poliovirus, rinovirus, coxsackie virus y FMDV, codifican para una proteasa (2A-pro) que corta el factor eIF4G en su extremo N-terminal. Los picornavirus utilizan un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para reclutar tanto al fragmento C-terminal de eIF4G y a los factores asociados (eIF4A y eIF3) para iniciar la traducción de sus mRNAs. Los Hantavirus posee una proteína de la nucleocápside (N), la cual puede unirse establemente al complejo de inicio 43S, al factor eIF2 α no fosforilado, así como mediar la disociación del RNA dúplex en el mRNA, pudiendo remplazar la función de algunas de las proteínas del complejo eIF4F^{20, 24, 38}. Se ha demostrado que el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) tienen la capacidad de activar al represor de la traducción 4E-BP1, esta proteína inhibe la traducción cap dependiente al unirse y secuestrar al factor de inicio eIF4E, aunque el mecanismo por el cual estos virus activan a 4E-BP1 no es conocido³⁸. Al modificar a estos diferentes factores, los virus aseguran la disponibilidad de los componentes necesarios para la traducción de sus proteínas, mientras inhiben la síntesis de proteínas celulares.

La importancia de la cinasa PKR en la respuesta antiviral es reiterada para la mayoría de los virus animales, los cuales han desarrollado diversas estrategias para evadir su activación durante el curso de la infección. Por ejemplo, la cinasa PKR es rápidamente degradada en células infectadas con picornavirus, mientras que otros virus codifican proteínas que inhiben ya sea directa o indirectamente la activación de esta cinasa. Algunas de estas proteínas virales como la NS1 del virus de la influenza, E3L de vaccinia, o la proteína $\sigma 3$ de reovirus, tienen la habilidad de secuestrar el RNAdc resultado de la replicación del genoma viral, al secuestrarlo lo ocultan de PKR y ésta no se activa. Por otra parte, productos virales tales como el RNA asociado a virus (VAI RNA) de los adenovirus, los pequeños RNAs nucleares codificados por el virus Epstein-Barr (EBER RNAs) o las proteínas E3 o NS5A del virus de la hepatitis C (HCV) parecen prevenir la activación de PKR mediante la unión a esta cinasa. El virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) expresa la proteína $v_134.5$ que promueve la defosforilación del factor eIF2 α al activar a la fosfatasa celular PP1 α , a fin de mantener una cantidad suficiente de eIF2 activo, no fosforilado, que permita la generación de complejos de inicio de la traducción. Otro ejemplo es la proteína K3L de vaccinia que funciona

como un pseudo-sustrato evitando que la cinasa PKR interactúe con su verdadero sustrato. Existen numerosos ejemplos de cómo los virus regulan diversos componentes de los complejos de inicio de la traducción y de regulación a la respuesta en condiciones de estrés^{24, 38}.

En algunos casos, la síntesis de proteínas virales puede proceder bajo condiciones de elevada fosforilación de eIF2 α , como se ha demostrado para el virus de la parálisis del grillo (CrPV) en el cual, un elemento IRES dirige la traducción del segundo cistron del RNA genómico del CrPV. Este IRES mimetiza un tRNA y dirige la incorporación del primer aminoácido alanina en vez de la metionina en el sitio A del ribosoma⁴. Los alfavirus también son capaces de sobrepasar la fosforilación del factor eIF2, la manera en que lo hacen parece estar mediada por una estructura de RNA denominada DLP, la cual parece localizar a los ribosomas en el sitio adecuado para el inicio de la traducción en el codon AUG. Se ha propuesto que cuando el factor eIF2 α esta fosforilado estos virus utilizan al factor de inicio eIF2A (factor ortólogo de eIF2), que puede llevar a cabo la función de eIF2 durante el inicio de la traducción⁴⁴. Los rotavirus también muestran independencia para la traducción de sus proteínas cuando el factor eIF2 se encuentra fosforilado, ya que a tiempos tempranos de la infección el factor eIF2 α es fosforilado, manteniéndose durante todo el ciclo de replicación viral²³; sin embargo, la estrategia por la cual los rotavirus sobrepasan la inhibición causada por la fosforilación del factor eIF2 y se lleva a cabo la traducción de sus proteínas se desconoce aún.

LOS ROTAVIRUS

Generalidades

Los rotavirus forman parte de la familia *Reoviridae* y son el principal agente causal de gastroenteritis severa en niños menores de cinco años, causando cada año alrededor de 111 millones de episodios de gastroenteritis, 25 millones de visitas clínicas, 2 millones de hospitalizaciones y 611,000 muertes, principalmente en países en desarrollo^{43, 45}. La incidencia de la infección por rotavirus es similar en países industrializados y en desarrollo, sugiriendo que un control adecuado de esta enfermedad no puede ser obtenido sólo mediante mejoras en las condiciones higiénicas y sanitarias. Se estima que alrededor de 1 de cada 293 niños enfermos mueren y un 82 % de estas muertes son en países pobres o en desarrollo^{42, 43}. En América Latina, los rotavirus son responsables de aproximadamente 15, 000 muertes y de 75, 000 hospitalizaciones anualmente, representando alrededor de un 50% de todas las hospitalizaciones

causadas por diarrea⁴². En México se estima que aproximadamente 2, 000 niños menores de 3 años mueren cada año por diarrea ocasionada por rotavirus¹⁵.

Los rotavirus han sido agrupados acorde a sus características serológicas en seis grupos (A-F), siendo los grupos A, B y C los más frecuentemente encontrados en animales y humanos, en tanto que los restantes sólo se han aislado de animales. El grupo A de rotavirus es el principal agente causal de enfermedades diarreicas en infantes y en crías de otros mamíferos, el grupo B ha sido asociado con epidemias de diarrea severa en adultos, principalmente en China y el grupo C sólo ha sido encontrado esporádicamente en niños y adultos alrededor del mundo¹⁴.

Dada su importancia en salud pública el grupo A es el más caracterizado, refiriéndose a éste el resto de la introducción. En los rotavirus del grupo A la designación está basada en determinantes de neutralización ubicados en las proteínas de la capa externa VP4 (serotipo P, por proteína sensible a proteasa) y VP7 (serotipo G, por glicoproteína). Existen un total de 15 diferentes serotipos G, de los cuales al menos 10 han sido asociados con infecciones en humanos y existen también 24 genotipos P de los cuales sólo 13 han sido correlacionados con serotipos. Los segmentos que codifican para las proteínas G y P pueden segregarse independientemente, pudiendo dar lugar a cepas con al menos 42 combinaciones de tipos G-P; sin embargo, sólo un pequeño número de cepas en los rotavirus que contienen los serotipos G1-G4 y G9 y los genotipos P1B, P2A y P1A son predominantes en humanos alrededor del mundo. En estudios recientes, cuatro tipos G (G1-G4) en conjunto con P1A o P1B representan alrededor del 88% de las cepas encontradas alrededor del mundo. La distribución de los serotipos G y P difiere geográficamente, la cepa P1A[8]G es la más predominante en el mundo, representando alrededor del 70% de las infecciones de rotavirus en humanos en Norte América, Europa y Australia, pero sólo el 30% de las infecciones en Sur América y Asia y alrededor del 23% en África⁷.

Estructura y Genoma

La partícula viral de rotavirus no posee una envoltura lipídica, tiene forma icosaédrica y mide alrededor de 100 nm. La partícula está constituida por tres capas concéntricas de proteína que engloban a los 11 segmentos de RNA de doble cadena (RNAdc) que conforman el genoma viral. La capa externa del virión está constituida por la glicoproteína VP7, de esta capa lisa se proyectan 60 espículas constituidas por la proteína VP4, cuya base interacciona con la capa intermedia del virus. La capa intermedia está constituida por trímeros de la proteína VP6, que es

la proteína más abundante del virión, mientras que la capa interna está formada por dímeros de la proteína de unión a RNA, VP2, la cual engloba al genoma viral. La cara interna de VP2 está asociada a su vez con la RNA polimerasa (VP1) y la guanililtransferasa (VP3) que están localizadas en los vértices del icosaedro y cuya función es la de replicar y modificar los genes del virus, respectivamente (Fig. 3).

El genoma de los rotavirus está constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena, que no es infeccioso en ausencia de proteínas virales; el tamaño de los segmentos varía de 660pb (segmento 11) del más pequeño, a 3300pb (segmento 1) del mayor, esta diferencia en tamaños permite la separación de los segmentos de RNAdc por electroforesis, generando un patrón característico, típico y único (Fig. 3). Los mRNA de rotavirus están provistos de un CAP en su extremo 5', pero carecen de la cadena poli(A) típica de mensajeros celulares en su extremo 3'. Cada segmento de RNA está flanqueado en los extremos 5' y 3' por secuencias no traducidas que varían en longitud y secuencia dependiendo del gen, pero que son conservadas en segmentos equivalentes entre las diferentes cepas del mismo grupo. Esta característica permite la formación de rearrreglos génicos cuando una célula es co-infectada con diferentes cepas de rotavirus^{14, 34}. Los rearrreglos genéticos son una fuente de variabilidad genética entre los rotavirus del mismo grupo, generando incluso cepas de importancia epidemiológica^{12, 41}.

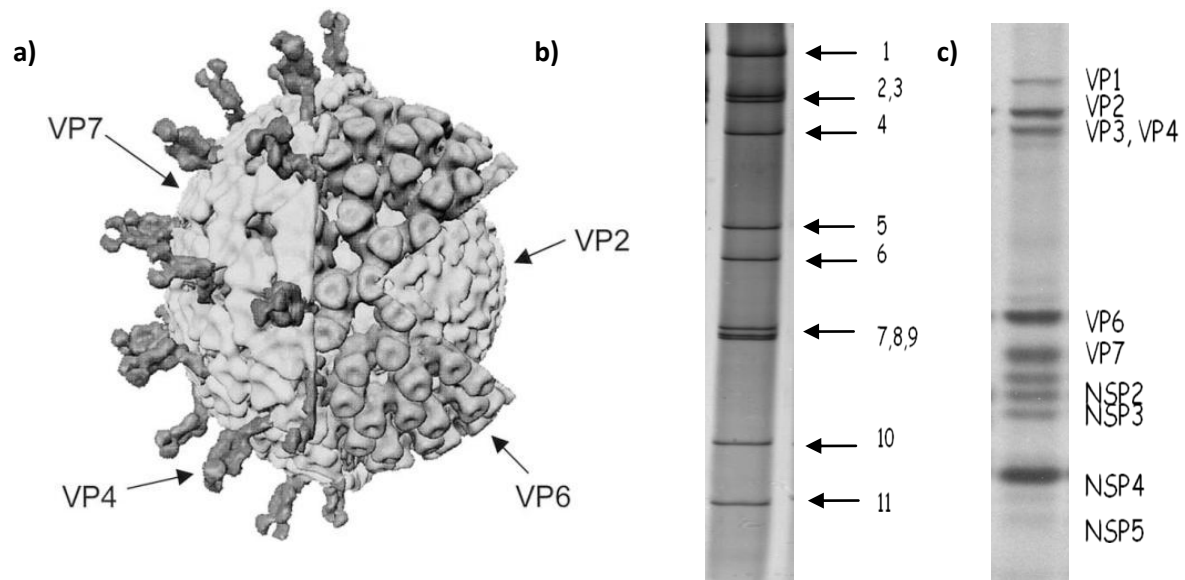


Fig. 3- Rotavirus, a) Criomicroscopía electrónica de la partícula viral, b) genoma y c) proteínas del virus¹².

En los rotavirus del grupo A cada segmento de RNA codifica para una proteína viral, excepto el segmento 11 el cual tiene dos marcos abiertos de lectura. Seis de los genes virales 1, 2, 3, 4, 6 y 9 codifican para las proteínas que forman la partícula viral y se denominan VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7, respectivamente. Los cinco genes restantes codifican para las proteínas no estructurales (NSP, Non Structural Proteins) llamadas NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 Y NSP6. Estas proteínas son sintetizadas durante la infección, tienen funciones relacionadas con el control de la síntesis de proteínas celulares y virales, la replicación viral, el empaquetamiento del genoma y la maduración de las partículas virales^{14,23}.

Ciclo replicativo de los Rotavirus

El ciclo replicativo de los rotavirus se lleva a cabo en el citoplasma celular. Después que el virus entra a la célula pierde su capa más externa formada por las proteínas VP4 y VP7 y se convierte en una partícula de doble capa, la cual es transcripcionalmente activa. Esta partícula de doble capa o DLP (Double layered particle) sintetiza RNAs que pueden ser utilizados ya sea para la traducción de las proteínas virales o como molde para la generación de RNA complementario para la formación del genoma viral.

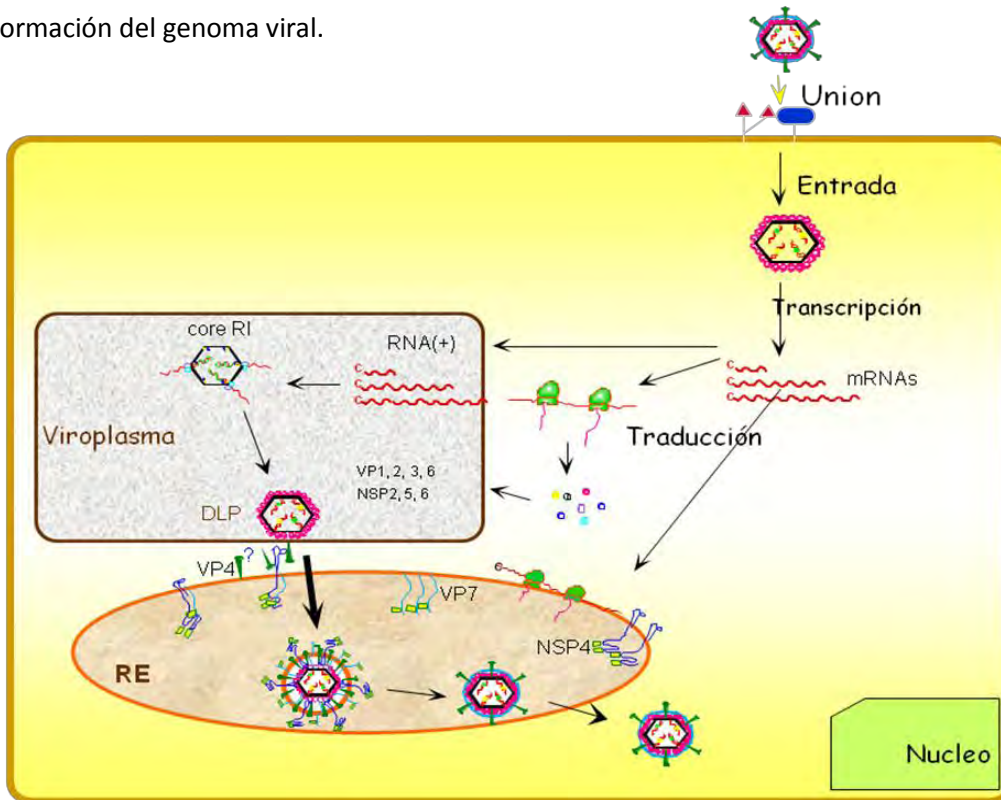


Fig. 4- Ciclo replicativo de los Rotavirus.

Una vez que se acumula una masa crítica de proteínas virales en el citoplasma celular, alrededor de 3-4 horas después de iniciar la infección, se forman unas estructuras electro-densas llamadas viroplasmos, compuestas por las proteínas NSP2, NSP5, NSP6, VP1, VP2, VP3 y VP6²⁵. Estas son estructuras clave para la replicación de los rotavirus, donde la síntesis del RNA^{dc} se lleva a cabo y se ensamblan las DLPs. La síntesis del RNA (-) se ha propuesto que ocurre a la par con el empaquetamiento del RNA (+) en partículas intermediarias de la replicación (compuestas por VP1, VP2, VP3, NSP2 y NSP5) donde se empaqueta y replica cada uno de los 11 segmentos del RNA viral. Posteriormente, a estos intermediarios de replicación se les adiciona la proteína VP6 para formar las DLPs que son (nuevamente) transcripcionalmente activas. Posteriormente las DLPs geman al interior del retículo endoplásmico (RE), este proceso es mediado por la afinidad de la proteína de la capsida VP6 hacia el dominio citosólico de la proteína transmembranal NSP4. Dos de las proteínas de rotavirus VP7 y NSP4 son sintetizadas en asociación con el RE y se mantienen asociadas a la membrana de este organelo. La NSP4 forma complejos con VP7 en el RE, creando regiones a través de las cuales las DLPs geman al interior del RE, NSP4 también interacciona con la proteína VP4, la cual forma parte de la capa externa del virus. Durante este proceso de gemación las DLPs adquieren una envoltura lipídica temporal, la cual es liberada para dar lugar a la partícula madura con tres capas de proteína, por un mecanismo todavía no conocido (Fig. 4). Finalmente las partículas virales completas son liberadas mediante lisis celular^{14, 18, 39}.

En cuanto al papel que tienen las proteínas no estructurales en el ciclo de los rotavirus, se sabe que la proteína NSP1 está involucrada en la evasión del sistema inmune innato marcando a ciertos factores celulares como IRF3, IRF5 e IRF7 para su degradación en el proteosoma¹⁰. La proteína NSP3 tiene la función de inhibir la síntesis de proteínas celulares mediante su interacción con el factor eIF4G. Las proteínas restantes NSP2, NSP4, NSP5 Y NSP6 tienen papeles más directos en la replicación del genoma y en el ensamblaje de la partícula viral. La proteína NSP4 como se ha mencionado anteriormente, está involucrada en la morfogénesis de los rotavirus. Se ha propuesto que NSP2 y NSP5 son las responsables de la formación de los viroplasmos y, a su vez, de la acumulación de las proteínas VP1 y VP2 en estas estructuras, esto mediante la afinidad de NSP2 por VP1 y NSP5 por VP2. NSP2 y NSP5 son proteínas que se unen al RNA y se ha propuesto que podrían contribuir a la acumulación del mRNA dentro de los viroplasmos y así llevar a cabo la replicación²⁸. Estas proteínas son cruciales para la formación de viroplasmos, ya que en ausencia de cualquiera de estas dos no se forman estas estructuras y el ciclo replicativo se interrumpe^{1, 2, 6,}

²¹. La proteína NSP6 es la menos conocida y su papel en el ciclo replicativo parece no ser esencial, ya que se han encontrado cepas humanas que no poseen un codón de inicio para NSP6, mientras que las cepas Alabama (de conejo) y OSU (de cerdo) parecen tener truncado el marco de lectura para NSP6³².

Algunas características del ciclo viral que son importantes de mencionar son: a) el mRNA es el único ácido nucleico viral que puede ser encontrado en el citoplasma de células infectadas, b) el RNA genómico ya sea parental o de la progenie está asociado a las partículas, por lo tanto, el RNAdc nunca es encontrado libre en el citoplasma; c) la actividad de la RNA polimerasa dependiente de RNA está asociada a la partícula viral³⁴.

REARREGLOS GENETICOS EN LOS ROTAVIRUS

La naturaleza segmentada del genoma permite a los rotavirus, al igual que a otros virus con genomas segmentados (reovirus²⁶, virus de la influenza²⁹, etc.), intercambiar genes por medio de un mecanismo conocido como rearreglo. Durante el ciclo replicativo de los rotavirus los segmentos génicos completos pueden intercambiarse cuando existe una co-infección de dos cepas diferentes en una misma célula.

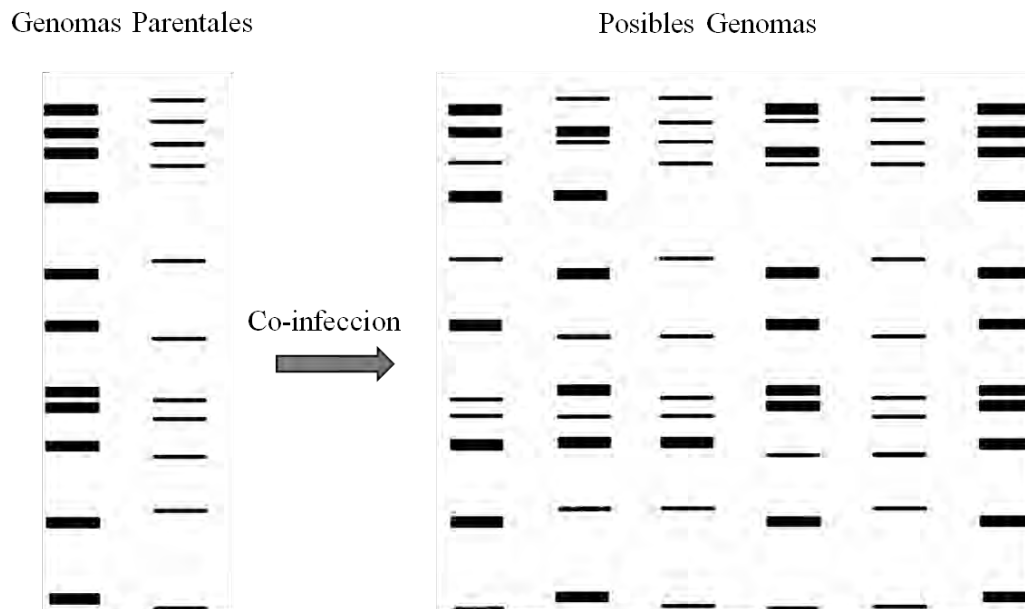


Fig. 5- Representación esquemática de un posible rearreglo en los rotavirus³⁴. Los genomas virales rearreglantes son analizados mediante migración electroforética de cada segmento.

El método más usado para diferenciar los segmentos génicos de cada cepa viral es mediante migración electroforética de los segmentos en geles de poliacrilamida^{34, 41} (Fig. 5).

El mecanismo de intercambio de segmentos génicos parece ser azaroso durante la co-infección en cultivos celulares, aunque se ha observado que el hospedero puede modificar la posible constelación de segmentos genómicos presentes en los rearreglantes aislados. Un análisis estadístico de rearreglantes de rotavirus en cepas bovinas y humanas en células MA104 y BSC-1 revela diferencias significativas en la frecuencia de los diferentes rearreglantes aislados, mostrando que ciertas constelaciones de genes son seleccionados diferencialmente en una línea celular sobre otra³⁴.

La capacidad de generación de rearreglos génicos en los rotavirus ha permitido el desarrollo de vacunas atenuadas en las que el fondo genético es de cepas animales, las cuales poseen una limitada capacidad de replicación en humanos y que generalmente no causan diarrea; entre estas cepas se encuentran NCDV, UK, WC3 y RRV y los genes de VP7 de distintos serotipos de origen humano. Esto se logra mediante co-infección de cepas animales con cepas humanas, seleccionando aquellas rearreglantes que posean el gen VP7 de algún serotipo de importancia epidemiológica (G1-G4) y el fondo genético de los rotavirus de origen animal^{10, 42}. Como ejemplos más representativos tenemos a las vacunas RotaShield y RotaTeq, las cuales fueron generadas mediante este método^{30, 45}.

Iturriza-Gomara *et al.*, estudiando cepas de rotavirus aisladas de humanos, encontró algunas cepas que poseen la proteína VP4 del tipo P[9] con una relación cercana con secuencias correspondientes con cepas de rotavirus felino, lo cual es indicativo de un posible rearreglo génico¹². Los rearreglos genéticos de rotavirus también han sido implicados en la generación natural de cepas de significancia epidemiológica in vivo, tales como la cepa G1P [4] en Argentina, o la cepa G2P [8] en Bangladesh. Se han encontrado también genes en rotavirus humanos que tienen secuencia similar con algunas cepas de origen animal, siendo estas cepas infecciosas e incluso más prevalentes en humanos. Como ejemplo esta la cepa 5P [8] aislada en Brasil, la cepa G9P [11] en la India y la cepa G9P [6] también aislada en la India y más recientemente en los Estados Unidos y Europa¹².

Los rearreglantes génicos de rotavirus se han utilizado como una poderosa herramienta para mapear las funciones de los genes virales y otros determinantes de fenotipos biológicos a

segmentos genómicos específicos, esto mediante la generación de rearreglantes y el posterior análisis de segregación del fenotipo deseado con algún segmento genético⁹. Este análisis requiere de marcadores genéticos con fenotipos específicos que pueden ser diferenciados en la progenie generada mediante las co-infecciones. Estos rearreglantes también han sido utilizados para detectar mutaciones letales condicionales tales como mutantes resistentes a la neutralización por anticuerpos, entre otros³⁴. Entre los fenotipos que han sido determinados mediante el uso de rearreglantes se encuentran: los determinantes de virulencia y patogénesis^{25, 34}, cambios en las propiedades hemaglutinantes^{25, 34}, determinantes de expansión ectópica de las infecciones³⁵, determinantes de neutralización⁵, determinantes de crecimiento viral en cultivos celulares, etc³⁴.

La capacidad para determinar fenotipos mediante el uso de rearreglos ilustra la utilidad de este método. Este sistema no sólo ha sido aplicado a los rotavirus, también en otros virus con genomas segmentados como el virus de la influenza. Pappas *et al*, reemplazaron los genes del virus de la influenza de 1918 con virus contemporáneos humanos H1N1 mediante rearreglos y encontraron que los genes de la hemaglutinina, neuraminidasa y la subunidad PB1 del complejo de la polimerasa viral son esenciales para alcanzar la máxima capacidad replicativa y de virulencia del virus pandémico de 1918²⁹.

ANTECEDENTES

El apagado de la síntesis de proteínas celulares (shut off) de la célula hospedera es un proceso en el cual la síntesis de proteínas celulares es severamente inhibida debido al control viral durante una infección. La traducción selectiva de los mRNAs virales durante este apagado celular es un proceso de múltiples componentes que han sido atribuidos a una serie de factores tales como: la perturbación de la concentración intracelular de iones, la alteración de la estabilidad de los RNA celulares, el procesamiento, exportación y el reclutamiento de factores celulares específicos⁸. El apagado de la síntesis de proteínas celulares es ventajoso para los virus, ya que les permite disponer de recursos celulares, incluyendo la maquinaria para la traducción de sus proteínas. Sin embargo, el virus debe contender con mecanismos celulares que responden específicamente a este apagado celular y generar mecanismos para: a) evitar los programas apoptóticos celulares y b) controlar la respuesta traduccional antiviral impuesta principalmente mediante la fosforilación del factor eIF2. Al evitar estos mecanismos de respuesta celular se

facilita la replicación viral, ya que se mantiene la integridad de la célula hospedera y se asegura la disponibilidad de los componentes traducionales^{8, 24}.

Al igual que con muchos otros virus, durante la infección por rotavirus ocurre el apagado de la síntesis de proteínas celulares, favoreciendo de esta manera la traducción de los mRNAs virales sobre los mRNAs celulares. El mecanismo por el cual los rotavirus llevan a cabo el apagado de la síntesis de proteínas celulares parece depender de la proteína NSP3, la cual se une a una secuencia consenso del extremo 3' de todos los mRNA virales (...GACC) por medio de su extremo N-terminal, así como a eIF4G1 mediante su dominio C-terminal de un modo similar a como lo hace PABP (Poly-A Binding Protein) pero con una mayor afinidad. Se ha propuesto que NSP3 evita la unión de PABP al eIF4G1, provocando el cese de la traducción de los mRNA celulares y favoreciendo la traducción de los mRNA virales^{23, 24}. Se ha propuesto también que NSP3 podría conferir estabilidad a los mRNAs virales^{4, 24}. También se ha reportado que cuando se expresa la proteína NSP3 en células testiculares de cerdo disminuye la expresión de proteínas cuyo mRNA tiene CAP y Poli-A o cuando se expresa NSP3 a partir de un virus vaccinia recombinante se observa una disminución en el nivel de la síntesis de proteínas celulares, la cual correlaciona con la concentración de NSP3 producida en la célula²⁷. Recientemente, en nuestro laboratorio se encontró que cuando se "silencia" la expresión de NSP3 mediante RNAs pequeños interferentes (siRNAs), se incrementa la síntesis del RNAdc y mRNA, también se observó un aumento de tres veces en la producción de progenie viral. Bajo esta condición, las proteínas virales se siguen traduciendo aún en ausencia de NSP3, observándose además un incremento en la tasa de síntesis de proteínas celulares, lo cual sugiere que NSP3 está involucrado directamente en el apagado de la síntesis de proteínas celulares, pero no en la síntesis de proteínas virales^{23, 24}.

Aunque se observó que en ausencia de NSP3 la tasa de síntesis de proteínas celulares se restablece, está no alcanza a ser igual a la síntesis en células no infectadas²⁴. Aunque muchos virus poseen mecanismos para evitar la respuesta a estrés inducida mediante la fosforilación del factor eIF2, en nuestro laboratorio se observó que durante el ciclo replicativo de rotavirus ocurre la fosforilación de eIF2 α ²⁴, de manera que se ha propuesto que el apagado o inhibición en la síntesis de proteínas celulares puede deberse a dos factores: 1) la interacción de la proteína NSP3 con el factor celular eIF4G evitando que PABP se una a éste y que la traducción de proteínas celulares se lleve a cabo y 2) la fosforilación del factor eIF2 α evita la formación del complejo ternario con lo

cual se evita la formación de complejos de inicio de la traducción y por ende el cese de la síntesis de proteínas.

Para determinar que proteína es la encargada de inducir o mantener el estado de fosforilación del factor eIF2 durante la infección por rotavirus, Montero *et al.*, silenciaron la expresión de todos los genes de rotavirus RRV, evaluando el efecto que el silenciamiento de cada proteína viral tiene sobre la síntesis de proteínas celulares y virales. Se encontró que cuando se silencian las proteínas VP1, VP3, VP4, VP7, NSP1, NSP3 y NSP4 la cantidad de las proteínas virales no cambia, y en todos estos casos existe el apagado en la síntesis de proteínas celulares, excepto cuando se silencia la expresión de la proteína NSP3 que, como se mencionó anteriormente, juega un papel importante en la inhibición de la síntesis de proteínas celulares²⁴.

En contraste, el silenciamiento de las proteínas VP2, NSP2, NSP5, y en menor medida VP6, causa una reducción general en la síntesis de proteínas virales, lo cual correlaciona con un incremento en la síntesis de proteínas celulares. Cuando se silencia la expresión de los genes VP2, NSP2 y NSP5, el estado de fosforilación de eIF2 se ve drásticamente disminuido, sugiriendo que estos genes tienen un papel importante ya sea en la inducción del estado de fosforilación o bien en mantenerlo. Las proteínas NSP2 y NSP5 están involucradas en la generación de viroplasmos y si son silenciadas la cantidad de viroplasmos disminuye o bien no se forman^{17, 24}. Todavía no es claro el porqué la ausencia de estas proteínas provoca la pérdida del estado de fosforilación del factor eIF2.

Algunos virus, sin embargo, no contienden contra el estado de fosforilación de eIF2, pudiendo incluso inducirla. Smith *et al.*, estudiando cepas de reovirus, demostraron que la fosforilación del factor eIF2 promueve la traducción de la proteína ATF4, una proteína de respuesta celular a estrés, que promueve un incremento en la eficiencia de replicación en reovirus y facilita la infección, además de provocar la formación de gránulos de estrés⁴⁰. Basado en este resultado se propuso que reovirus se beneficia de la fosforilación del factor eIF2 mediante dos vías: a) induciendo un programa de expresión dependiente de ATF4 y b) creando un ambiente con abundantes transcritos de reovirus como una ventaja competitiva para los componentes de la maquinaria traduccional.

En nuestro laboratorio, M. Rojas encontró que el grado en el que rotavirus apagan la síntesis celular y el grado de fosforilación del factor eIF2 varía dependiendo de la cepa de rotavirus (Fig. 6). En el presente trabajo se estudiaron dos cepas de rotavirus, la cepa porcina YM³⁶ y la cepa

de simio RRV, estos virus presentan características fenotípicas notables en cuanto al modo en que apagan la síntesis de proteínas celulares y el grado de fosforilación del factor eIF2. Mientras que la cepa porcina YM apaga severamente la síntesis de proteínas celulares, RRV permite una mayor traducción de proteínas celulares. Además, durante la infección con estas dos cepas se encontraron diferencias en cuanto al estado de fosforilación del factor eIF2 α . En el caso de la infección con YM se observó una menor fosforilación del factor eIF2 α con respecto a la presentada por RRV y aún así el apagado en la síntesis celular es más severa en células infectadas con YM (Fig. 6).

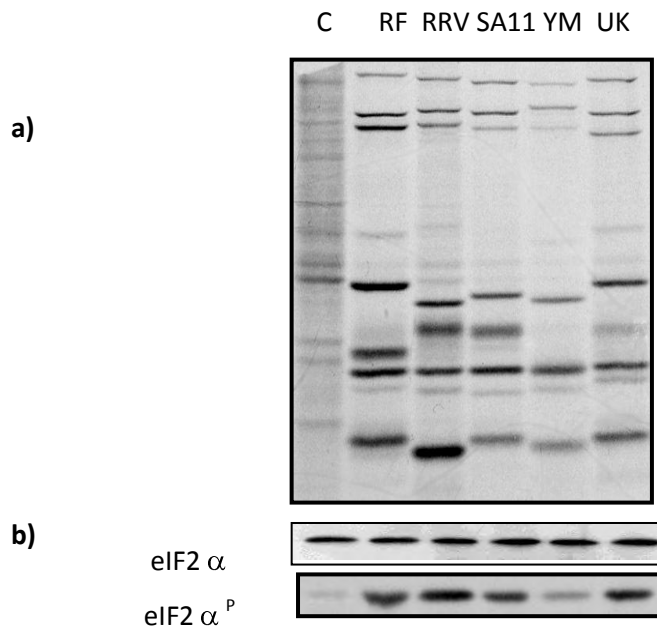


Fig. 6- Marcaje metabólico de proteínas con S^{35} y western blot del factor eIF2 total o fosforilado en células MA104 infectadas con diferentes cepas de rotavirus³⁷. a) Células infectadas con diferentes cepas de rotavirus a 8 Horas post-infección (Hpi) marcadas con S^{35} , b) Detección del factor eIF2 total (eIF2 α) o fosforilado (eIF2 α^P). C=Control de células sin infectar

Para determinar cual o cuales segmentos genéticos están relacionados con características fenotípicas específicas del apagado de la síntesis de proteínas celulares y la fosforilación del factor eIF2 α , en este estudio se generaron rearreglantes entre las cepas de rotavirus YM y RRV mediante co-infecciones en células MA104.

HIPOTESIS

El análisis de rearreglantes entre los rotavirus YM y RRV nos permitirá identificar el o los genes virales involucrados en el apagado celular diferencial de la síntesis de proteínas entre estas dos cepas.

OBJETIVO

Determinar cuál o cuáles genes virales están involucrados en el apagado de la síntesis de proteínas celulares durante la infección por rotavirus.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Obtener rearreglantes de cada uno de los segmentos de los virus YM y RRV.
- 2) Determinar el origen parental de cada uno de los segmentos de los virus rearreglantes aislados.
- 3) Analizar las diferencias fenotípicas obtenidas en cada uno de los rearreglantes seleccionados en cuanto a la síntesis de proteínas celulares y la fosforilación del factor eIF2 α .
- 4) Establecer con cuál o cuáles segmentos génicos segrega el fenotipo de inhibición de la síntesis celular.

MATERIALES Y METODOS

Co-infección de rotavirus en células MA104

Para obtener rearreglantes entre las cepas YM y RRV, células MA104 confluentes fueron co-infectadas a diferentes multiplicidades de infección (MOI) con estos dos virus. Inicialmente los virus parentales tanto RRV y YM se activaron separadamente con 10µg/ml de tripsina durante 30 minutos a 37°C, posteriormente ambos virus fueron mezclados y se dejaron adsorber en capas confluentes de células MA104 durante 60 min a 37°C. Transcurrida la incubación, se lavó la monocapa con medio MEM sin suero para retirar el exceso de virus y se añadió medio MEM, dejando incubar nuevamente las células hasta que se observó efecto citopático. El lisado resultante se cosechó y los virus resultantes se aislaron por plaqueo.

Aislamiento de rotavirus en placa

El aislamiento de los rearreglantes se realizó en placas de 6 pozos con células MA104 confluentes, el lisado viral obtenido de la co-infección entre las dos cepas se activó con 10µg/ml de tripsina durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente cada pozo se infectó con diferentes diluciones del lisado viral activado y se dejó absorber durante 60 min a 37°C. Se lavaron los pozos con medio MEM sin suero para quitar el exceso de virus no absorbidos y se adicionaron 3 ml /pozo de MEM/agarosa al 6%, suplementado con 29 mg de glutamina y 5 mg/ml de tripsina, permitiendo la gelificación de la agarosa en una superficie plana, se incubó de 2-3 días a 37°C con 5% CO₂. Transcurrida la incubación se añadió a cada pozo 500 µl de una dilución 1:50 de rojo neutro en MEM sin suero, se dejó incubar 2 horas en obscuridad, posteriormente se retiró el colorante y se visualizaron las placas virales. Las placas se recuperaron y se re-suspendieron en 1 ml de MEM sin suero.

Para determinar que placas pertenecen a virus rearreglantes, se seleccionaron aquellas placas cuyo RNA presentó un patrón electroforético mixto de bandas con respecto a las cepas parentales (YM y RRV). Las placas seleccionadas fueron posteriormente re-plaqueadas para asegurar que las partículas virales fueran infecciosas, viables y sin contaminación con otro rearreglante.

Extracción de RNA viral

A 300µl de lisado de células infectadas se le adicionan 30µl de amortiguado de lisis 10X (Tris-Base 2.6M, EDTA 750mM, SDS 450mM, NaCl 6.8 M, β-Mercaptoetanol 1.8M) y se agitó. Se le añadió 300µl de fenol saturado pH 8.0, se agita en vortex durante dos minutos, posteriormente se le adicionan 300µl de una solución 24:1 de cloroformo y alcohol isoamilico respectivamente y se agita en vortex durante otros dos minutos, para posteriormente centrifugarse a 12,000 rpm durante 5 min. Se toma la fase superior acuosa y se le agregan 2.5 volúmenes (750µl) de etanol absoluto, se agitan en vortex durante dos minutos y se centrifuga 15 minutos a 12,000 rpm. Se desecha el sobrenadante y el pellet se resuspende en 20µl de agua destilada. Al RNA extraído se le agrega un volumen igual de solución de carga (glicerol 30%, azul de Bromofenol 1%, 20mM Tris-150mM glicina).

Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (9ml de agua destilada, 3.8ml de Tris 2M pH 8.8, 6.6ml de Acrilamida-Bis 30-0.8%, 250 µl de Persulfato de amonio 10% y 6 µl de TEMED), en amortiguador de corrida Tris-Glicina (20mM Tris, 150mM glicina) las muestras se separaron a 13 mA durante 13 horas.

La visualización del RNA se realizó mediante tinción con nitrato de plata, para esto el gel se colocó en una solución fijadora (287 ml de etanol, 3ml de ácido acético para solución 10X) durante 30 minutos y se mantiene en agitación constante. Se retiró la solución fijadora y se le adicionó solución de nitrato de plata (11 mM) dejando 30 min en agitación constante, para posteriormente retirar la solución de plata y lavar dos veces con agua destilada. Por último se le adiciona solución reveladora (700 mM NaOH, 0.8% formaldehído) hasta que se observó la aparición de bandas, entonces se retira la solución reveladora y se detiene la reacción con ácido acético al 10%.

Titulación viral

La titulación de los virus seleccionados se realizó en placas de 96 pozos con células MA104. Los lisados de células infectadas fueron activados con 10µg/ml de tripsina durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se realizaron diluciones seriadas de estos lisados y cada una de ellas fue adsorbida sobre la monocapa de células MA104 en un pozo de la placa de 96 durante 1 hora a 37°C, una vez transcurrido este tiempo los pozos se lavaron dos veces con 100µl de medio MEM sin suero para retirar el excedente de virus y se dejó incubar a 37°C, 5% CO₂. El título viral se obtuvo mediante ensayo de "foco" con inmunoperoxidasa a las 16 horas post-Infección²¹.

Ensayo de focos de inmunoperoxidasa

En este método las células son fijadas con acetona al 80% v/v en PBS durante 30 min. Posteriormente se realizó un lavado con amortiguador PBS (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1.7mM para solución 10X), se retiró el PBS y se agregó el anticuerpo primario policlonal contra rotavirus (generado en este laboratorio) a una dilución de 1:2000 v/v en PBS durante 60 min a 37° C, se realizó un segundo lavado con 100µl de PBS, se retiró y se agregó Proteína A peroxidasa (Amersham- Pharmacia Biotech) a una dilución de 1:3000 v/v en PBS. Para la detección de células infectadas las placas se lavaron con PBS y se le agregaron 50µl de una solución de 1.5 ml de 3-amino-9-etil carbazole (0.8g de carbazole en 200ml de N,N-dimetil formamida), 5ml de amortiguador de acetatos (ácido acético 0.5N, acetato de sodio 500mM) y 15µl de solución de peróxido de hidrogeno 3.35%, obteniendo un color rojizo en las células infectadas debido a la precipitación del sustrato, una vez que se observan las placas, se lavan los pozos con agua para detener la reacción. La determinación del título viral se realizó contando células infectadas (focos infecciosos) en cada una de las diluciones y el título se obtiene al multiplicar el número de focos observados x la dilución del virus x 20 (factor de volumen, 50µl) x 5= Unidades formadoras de focos infecciosos por mililitro (UFF/ml)

Caracterización génica de los rearreglantes

A los segmentos génicos que no se distinguen por diferencias en su migración electroforética o bien para corroborar el origen de los segmentos génicos en las clonas rearreglantes, se amplificó cada gen con oligonucleótidos específicos. Para la obtención del RNA inicialmente se infectaron cajas de seis pozos con cada uno de los rearreglantes para posteriormente ser cosechados a las seis horas post-infección y se realizó la extracción del RNA con Trizol (Invitrogen) acorde a las instrucciones del proveedor. Brevemente, a 100µl de lisado de células infectadas se le agregan 9 volúmenes de Trizol y se agitó en vortex, se agregaron 200µl de cloroformo y se agitó en vortex. Se centrifugó 15 minutos con 14,000rpm a 4 ° C, se recupera la fase acuosa superior y se agregó un volumen igual de isopropanol y se centrifugó nuevamente 15 minutos con 14,000rpm a 4 ° C. Se decantó el sobrenadante y el botón que contiene el RNA se lavó con 200µl de etanol absoluto centrifugando 10 minutos a 13,000rpm a temperatura ambiente. Se retiró el etanol y el RNA se resuspendió en 10µl de agua.

Transcripción reversa y PCR

Para la realización de la transcripción reversa se mezclaron 500ng de RNA total, con 40pmol de oligo 3' y agua para un volumen total de 5µl. La solución se hierve durante 3 minutos e inmediatamente se pasó a hielo durante 2 minutos. Para los genes 6, 9 y 10 se utilizó la transcriptasa reversa M-MluV, para ello se preparó una solución de 4.4µl de Buffer M-MluV-RT 10X, 4.4µl de solución 5mM de dNTPs, 1.1µl de inhibidor de RNAsas, 0.66µl de la transcriptasa reversa M-MluV y 22.44µl de agua para un vol. final de 33µl. Se toman 15µl de la solución para cada reacción, se mezclan con los 5µl de la solución RNA-oligo para un vol. final de 20µl y se mantienen 60 min. a 42 °C, finalmente la transcriptasa reversa se inactiva a 65°C durante 20 min. Para los genes restantes (1, 2, 3, 7 y 8) se utilizó la transcriptasa reversa SuperScript III, preparándose una solución de 8.8µl de buffer 5X, 4.4µl de solución 5mM de dNTPs, 4.4µl de DTT 0.1M, 1.1µl de inhibidor de RNAsas, 0.66µl de SuperScript III y 13.64µl de agua para un vol. final de 33µl. Se toman 15µl de la mezcla para cada reacción, se mezclan con los 5µl de la solución RNA-oligo para un vol. final de 20µl y se incuban 60 min a 55 °C, se inactiva la SuperScript III a 85°C durante 5 min.

Para el PCR se realizó la siguiente mezcla: 4.5 de una solución 5mM de dNTPs, 11.25µl de amortiguador "Buffer" Termo Pol 10X, 1.35µl de Vent DNA polimerasa y 77.4µl de agua para un Vol. Final de 94.5, se toman 21µl de esta mezcla de PCR para cada reacción y se mezclan con 1µl de 50pmol/µl de oligos 5' y 3' y con 2µl del producto de la reacción de transcripción Reversa para un vol. final de 25µl. Las condiciones para el PCR fueron similares, variando solo la temperatura de alineamiento (X) y el tiempo de extensión (X). Tanto las condiciones de temperatura y tiempo se muestran en la sección de oligonucleótidos.

Ciclos	Tiempo	Temperatura
1ciclo	3 min	94°C
30 ciclos	30 seg.	94°C
	30 seg.	X
	X	72°C
1ciclo	5 min	72°C

Cada uno de los productos de PCR fue digerido con enzimas de restricción específicas para cada cepa de acuerdo a las condiciones del proveedor, determinando así el origen de los genes acorde al patrón de corte en sitios únicos para cada cepa (Tabla 1).

Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes por PCR

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR, las temperaturas de alineamiento y el tiempo de extensión para cada uno de los genes se muestran en la siguiente tabla:

Secuencia de Oligos para la amplificación por PCR			
		Temp. Alin.	Tiempo (min)
Gen 1	YM1-5' cagaccgggtacctattaaagctataca	52 °C	2
	YM1-3' gttgtcttgattcacc		
Gen 2	YM2-5' cagaccgggtacctattaaaggctcaat	49 °C	1.3
	YM2-3' cagaccgggcccgggtcatatctccacagtg		
Gen 3	YM3-5' cagaccgggtaccattaaagcagtacc	52 °C	2
	YM3-3' cctctatcagttcttatgtc		
Gen 6	YM6-5' cagaccgggtaccttttaaacgaagtcttc	50 °C	1
	YM6-3' cagaccgggcccgggtcacatcctctcact		
Gen 7	YM7-5' cagaccgggtaccttttaagtctttcagtg	50 °C	2
	YM7-3' cagaccgggcccgggtcaacataacgccctatag		
Gen 8	YM8-5' cagaccgggtaccttttaaacgctctcagtc	50 °C	2
	YM8-3' cagaccgggcccgggtcacataagcgtttct		
Gen 9	YM9-5' gctccttttaagtatgg	52 °C	2
	YM9-3' cagaccgggcccgggtcacatcatacaattc		
Gen 10	YM 10-5' cagaccgggtaccttttaaaagtctgttcc	50 °C	1
	YM 10-3' cagaccgggcccgggtcacattaagaccgttc		

Enzimas utilizadas para el RT-PCR y digestión de los productos de PCR

Como se mencionó anteriormente, la transcripción reversa fue realizada con las enzimas Superscript III RT y M-MluvRT acorde a las instrucciones del proveedor, las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo con la Vent DNA polimerasa y las enzimas utilizadas para todas las digestiones fueron: Acc1, BamH1, Bcl1, BspHI, Dral, EcoRI, HaeII, HincII, HindIII, Tth111I, Xba1, todas obtenidas de New England Biolabs y usadas de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Los sitios de corte fueron determinados mediante búsqueda y selección de sitios únicos de restricción para cada gen, utilizando el programa DNA Strider 3.0

Marcaje metabólico

Las células MA104 fueron sembradas en cajas de 48 pozos y se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 5, a 7.5 horas post-infección el medio fue retirado y substituido por medio MEM sin metionina, suplementado con 25 μ Ci de Easy Tag Express (S^{35}) durante 30 minutos. Se retiró el medio y se lisaron las células en amortiguador con inhibidor de proteasas y fosfatasas (50mM Tris pH 7.4, KCl 100mM, EDTA 1mM, NaF 50mM, ortovanadato de sodio 10mM, ditioneitol 1mM, glicerol 10%, Triton X-100 1% e inhibidor de proteasas). A las muestras se les adicionó 30 μ l de amortiguador de carga (30% glicerol, SDS 5%, azul de bromofenol 1%, β -Mercaptoetanol 5%, Tris 0.3M pH 8.8) y se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10% (1.9ml de agua destilada, 720 μ l de Tris 2M pH 8.8, 1.3ml de Acrilamida-Bis 30-0.8%, 36.5 μ l de SDS 10%, 25 μ l de persulfato de amonio y 4 μ l de TEMED) en amortiguador Tris-Glicina SDS (20mM Tris, 150mM glicina, SDS 0.08%). Los lisados de células infectadas se separaron en geles de poliacrilamida al 10% y se expusieron a placas de rayos X para visualizar las proteínas marcadas. Las proteínas marcadas también fueron visualizadas mediante detección con el programa phosphorimager mediante el Typhoon Trio™ Variable Mode Imager.

Western blot del factor eIF2 total y fosforilado

Los lisados de células infectadas fueron separados en geles de poliacrilamida al 15%; posteriormente las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa por 1 hora a 130 mA en amortiguador CAPS-10% metanol. La membrana se bloqueó 12 hrs a 4°C en solución PBS, Tween 1%, BSA 5%. Se le adicionó el anticuerpo anti-eIF2 fosforilado (Ser51) en una dilución 1:1000 en PBS, Tween 1%, BSA 5% y se incubó durante 24 hrs a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación, la membrana se lavó 3 veces (10 min c/u) con PBS-Tween 1% y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado al fluoroforo alexa 647 a una dilución 1:5000 en PBS, Tween 1%, Leche 5% durante 60 minutos. La membrana se lavó tres veces (10 min c/u) con PBS, Tween 1% y se determinó la fluorescencia utilizando el Typhoon Trio™ Variable Mode Imager. Se usó el mismo procedimiento para el eIF2 total, solo cambiando el anticuerpo primario por el anticuerpo anti-eIF2. Los anticuerpos para la forma fosforilada y no fosforilada de eIF2 se obtuvieron de Cell Signalling.

Detección de LDH liberado

La detección de lisis celular se realizó mediante la determinación de LDH liberado al medio como una función de la integridad de la membrana, para ello se utilizó el Kit TOX7-1KT (SIGMA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se preparó una mezcla de detección con cantidades iguales de sustrato de LDH, Cofactor NAD y la solución colorante. Para determinar el LDH liberado se tomó un volumen de medio removido de cada muestra y se colocó en una placa de 96 pozos, agregándose un volumen igual de la mezcla para detección de LDH, la placa se protegió de la luz y se mantuvo a temperatura ambiente por 20- 30 minutos. La reacción finalizó con la adición de 1/10 del volumen de 1N HCl a cada pozo, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm, a esta medida se le resta el fondo de la reacción que se mide a 630 nm. Para determinar la absorbancia de las muestras se utilizó el espectrofotómetro Bio-Tek EL311 AutoReader. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante la prueba de ANOVA de una vía para determinar si las medias en los diferentes grupos es igual, posteriormente se aplicó la prueba de Diferencia Honestamente Significativa de Tukey para comparar cada grupo con todos los demás, y determinar el “tipo de fenotipo”. Ambas pruebas se realizaron con un intervalo de confianza del 95%, y se utilizó el programa ORIGINLAB 8. El análisis de regresión no lineal realizado a los datos de liberación de LDH en las cepas parentales y rearreglantes fue realizado utilizando el programa Prisma 4.0

RESULTADOS y DISCUSION

Generación y caracterización de rearreglantes

El primer paso de este proyecto fue la selección de rearreglantes a partir de coinfecciones de cepas de rotavirus YM y RRV. Las células MA104 se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 3, e inicialmente se seleccionaron 60 placas de diferente tamaño. El RNA de cada placa fue extraído y analizado en geles de poliacrilamida al 10%, revelando mediante tinción de plata. Se seleccionaron las placas que mostraran un patrón de bandas de RNA de doble cadena (RNAdc) diferente al de las cepas parentales (figura 7). Además se les realizó un re-plaqueo para descartar que existieran mezclas de virus, que los virus seleccionados no fueran estables o infecciosos. Posteriormente se realizó una segunda ronda de selección en geles de poliacrilamida para asegurar el electroferotipo de cada placa seleccionada. Al término de estas selecciones nos quedamos con 15 probables rearreglantes de las 60 placas analizadas inicialmente. En la figura 7 se muestran los geles con los 15 rearreglantes elegidos con base en su patrón de migración electroforética (la clona 30-2 fue posteriormente excluida), los números indican el número de placa de la que provienen y el numero del segundo re-plaqueo realizado.

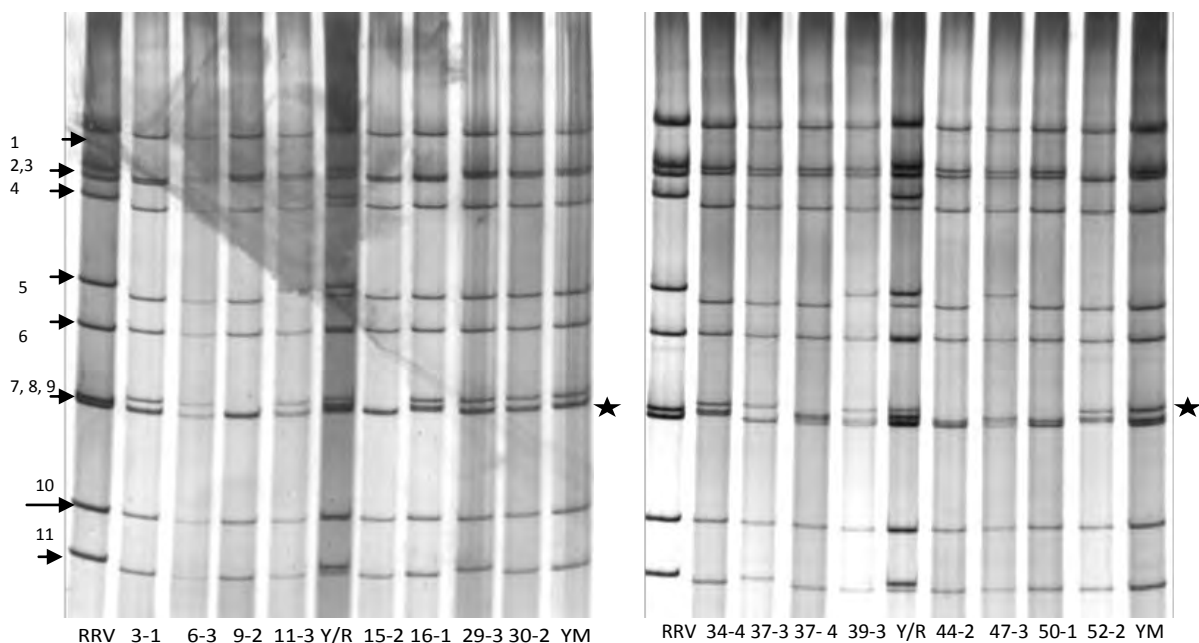


Fig. 7- Geles de poliacrilamida-SDS al 10% con rearreglantes seleccionados. RRV y YM son las cepas parentales; Y/R es la mezcla del RNA extraído de ambos virus parentales, la estrella indica la zona de mayor variabilidad visible en los rearreglantes.

Como se puede observar, existen segmentos génicos que son difíciles de clasificar con base en su migración electroforética, en especial los segmentos 1, 3, 6, 8, 9 y 10, ya que presentan co-migración con los genes parentales o bien migran muy juntos para poder distinguirlos.

Una característica que se observa en los geles es que la mayoría de los genes que pueden ser diferenciados con facilidad parecen ser de la cepa YM, quizás esto se deba a que YM tiene una velocidad mayor de crecimiento en cultivo que RRV, por lo cual no encontramos un mosaico de bandas, sino pequeñas variaciones que corresponderían a algunos genes de RRV o bien a que los genes de YM presenten alguna ventaja funcional o biológica a los rearreglantes obtenidos.

Como segundo objetivo de este trabajo verificamos el origen parental de los segmentos génicos de cada rearreglante, para esto realizamos la amplificación de cada uno de los genes problema mediante RT-PCR con oligonucleótidos específicos para cada segmento (ver tabla en metodología), en particular aquellos que no pudieron ser correctamente asignados mediante electroforesis. Los oligonucleótidos utilizados han sido usados en nuestro laboratorio para la amplificación de los genes tanto de YM como de RRV; los cuales flanquean los extremos 5' y 3' de su respectivo gen, por lo tanto, amplifican la secuencia completa para los genes 6, 7, 8 y 10, en tanto que para los genes 1, 2, 3 y 9 se diseñaron oligonucleótidos para amplificar un fragmento del gen. En la figura 8 se muestra el producto de RT-PCR de los genes 8 y 10 de los primeros rearreglantes obtenidos.

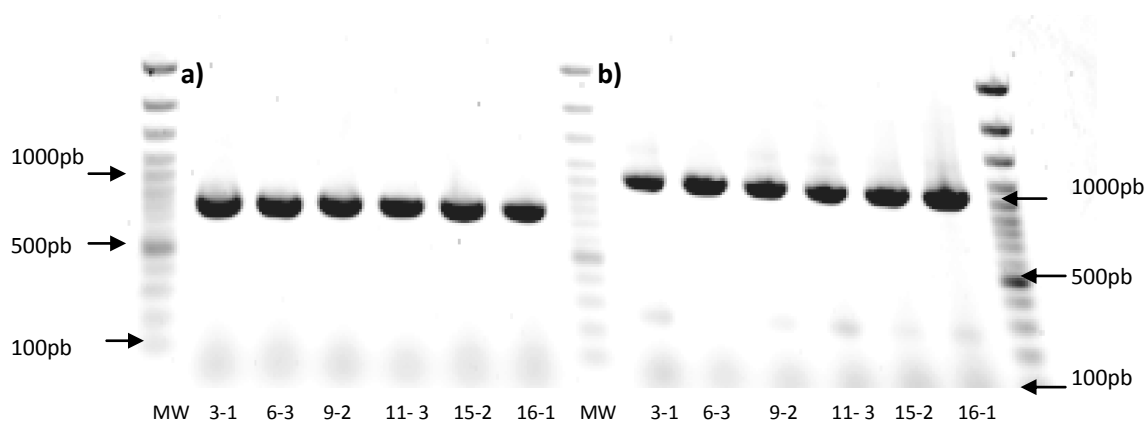


Fig. 8– **Productos de amplificación por RT-PCR del gene 10 y del gen 8 de algunos rearreglantes.** Los fragmentos de PCR que esperamos de cada amplificación para: a) para el gen 10 de alrededor de 768 pb y b) el gen 8 es de alrededor de 1050 pb.

Además, amplificamos los genes 1, 2, 3, 6, 7 y 9. Una vez que logramos amplificar los genes, procedimos a hacer digestiones con enzimas de restricción en sitios únicos y específicos para cada gen que nos permitiera distinguir su origen. Los genes y las enzimas utilizadas, así como los pesos esperados de los productos de corte se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Enzimas de restricción y pesos esperados con cada gen parental YM y RRV.

Enzima	Tamaño esperado / cepa		Gen
	YM	RRV	
BspH I	NC	669 y 550	Gen1
Ban II	1100 y 183	NC	Gen1
Acc I	NC	990 y 211	Gen2
Tth111I	1055 y 156	NC	Gen2
Bcl I	NC	688 y 363	Gen3
Dra I	929 y 121	NC	Gen3
HinCII	NC	672 y 542	Gen6
HaeII	953 y 403	NC	Gen6
HindIII	NC	838 y 240	Gen7
XbaI	538 y 537	NC	Gen7
BclI	NC	825 y 233	Gen8
Accl	950 y 150	NC	Gen8
Tth111I	NC	730 y 332	Gen9
EcoRI	793 y 249	NC	Gen9
BamHI	NC	631 y 137	Gen10
Acc1	434 y 316	NC	Gen10

*NC= no corta

Estos sitios fueron determinados por medio del programa DNA Strider 3.0, con el que seleccionamos sitios cuyos productos de corte fueran fácilmente distinguibles mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 %.

En la figura 9 se ejemplifican los productos obtenidos de la amplificación por RT-PCR para el gen 10, como se observa, los rearreglantes se cortan de acuerdo al patrón esperado para la cepa YM con la enzima Accl y no se corta el producto de amplificación de la cepa RRV, lo contrario sucede con la enzima BamHI tal y como se espera si los productos de corte son específicos para cada cepa.

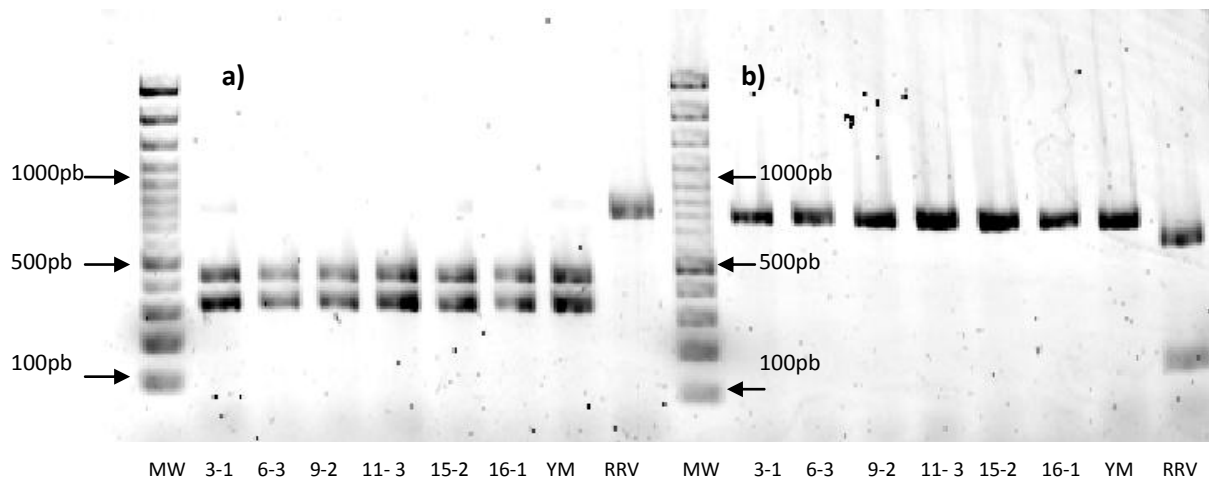


Fig. 9- Digestiones del producto de PCR del Gen 10 con enzimas de restricción a) Accl y b) BamHI.

En la figura 10 observamos el producto de amplificación del gen 7 y el corte con enzimas de restricción para cada cepa, observándose que existen una combinación de genes en los rearreglantes, las clonas 3-1, 6-3, 11-3 y 16-1 son de origen YM, ya que se cortaron con la enzima específica para esta cepa, mientras que las clonas 9-2 y 15-2 tienen el gen 7 cuya cepa parental es RRV.

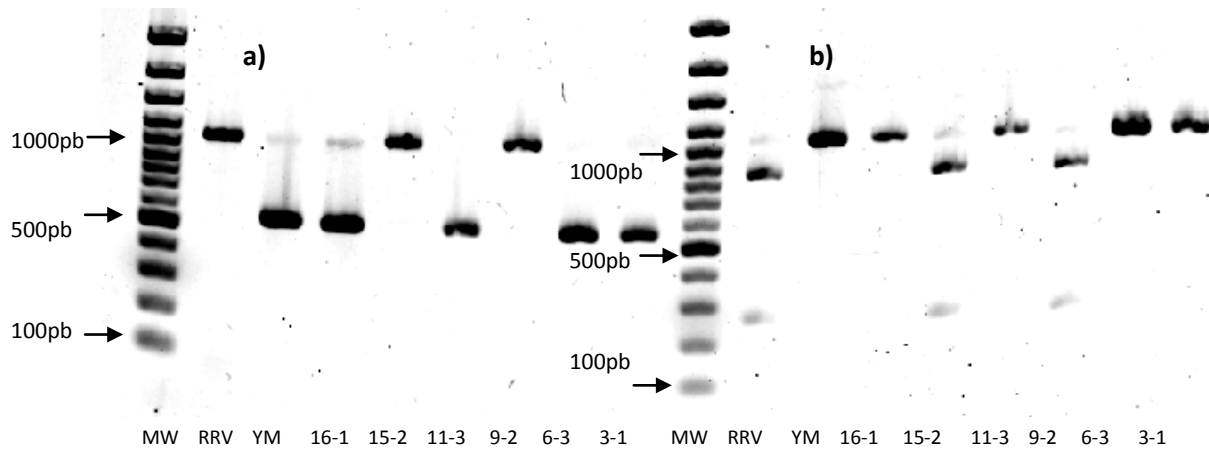


Fig. 10- Digestiones del producto de PCR del Gen 7 con enzimas de restricción a) Xba I y b) Hind III.

Se realizó la amplificación de los genes 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10 y el corte de los genes con las enzimas de restricción para cada gen. Los genes 4, 5 y 11 sólo fueron corroborados mediante migración en geles de poliacrilamida al 10%, ya que pueden ser claramente distinguibles por electroforesis.

La tabla 2 muestra un resumen con todos los resultados obtenidos. Lo primero que resalta es la ausencia de rearreglantes que tengan los segmentos génicos de RRV de los genes 1, 2, 3, 4, 6, y 10. De entre las clonas seleccionadas se encuentra la clona 3-1, que a pesar de tener diferencias en

cuanto a la migración de algunos segmentos resultó ser idéntica a la cepa YM. Otra clona seleccionada que presenta diferencias en la migración de los segmentos 2 y 3, fue la 52-2, esta clona es monogénica, con el segmento 9 de la cepa RRV en el fondo genético de la cepa YM.

Tabla 2. Origen parental de los segmentos génicos de cada rearreglante (primera co-infección).

GENES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
VIRUS	VP1	VP2	VP3	VP4	NSP1	VP6	NSP3	NSP2	VP7	NSP4	NSP5/6
RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV
YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM
3-1	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM
6-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM
9-2	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM
11-3	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM	YM	YM
15-2	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM
16-1	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM
29-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV
34-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM
37-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV
37-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	RRV	YM	YM
39-3	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM	YM	YM
44-2	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM
47-3	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	RRV	YM	RRV	YM	YM
50-1	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM
52-2	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM

Los genes de RRV están indicados en color verde y los de la cepa YM en azul.

Entre las clonas seleccionadas se obtuvieron rearreglantes monogénicos en los genes 5, 7, 8, 9 y 11, sólo dos rearreglantes que son digénicos en los genes 8 y 11 (37-3) y 7 y 9 (37-4) y sólo un rearreglante con genoma de más de dos genes, que es la clona 47-3 con los segmentos 5, 7, y 9 en el fondo genético de la cepa YM. Los rearreglantes seleccionados no fueron sometidos a presión de selección y, sin embargo, ciertos genes fueron favorecidos, por ejemplo, el gen 7 que fue seleccionado 6 veces en las 15 clonas (4 en rearreglantes monogénicas) y el segmento 9 que fue seleccionado 5 veces (3 en rearreglantes monogénicas).

Continuando con la caracterización de los segmentos genéticos de cada rearreglante se realizó un análisis de síntesis de proteínas virales mediante marcaje metabólico con S³⁵ para corroborar lo

observado mediante cortes con enzimas de restricción, ya que las proteínas VP1, VP2 y VP7 codificadas por los genes 1, 2 y 9, respectivamente, presentan una migración diferencial entre las proteínas de ambas cepas parentales, permitiendo tener otro método de asignar y/o corroborar el origen de los segmentos génicos. En la figura 11 se muestran las diferencias en la migración de los productos de los genes 1 y 2 entre las cepas YM y RRV. Como se observa en la imagen, ninguno de los rearreglantes en las proteínas VP1 y VP2 migran a la altura de las proteínas correspondientes para RRV, con lo cual se confirma que todos los rearreglantes seleccionados durante la primera co-infección tienen los segmentos 1 y 2 provenientes de la cepa YM, tal y como se determinó mediante el análisis con enzimas de restricción.

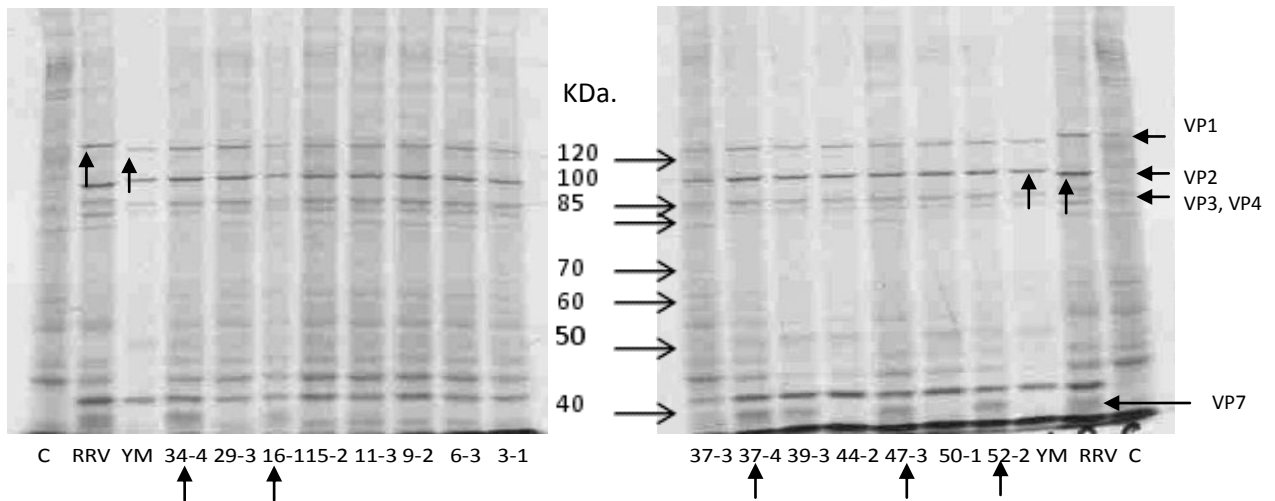


Fig. 11- Autoradiografía de la electroforesis de lisados de células infectadas con cepas rearreglantes. La flecha indica los virus rearreglantes que presentan la proteína VP7 de RRV y las diferencias en migración de las proteínas VP1 y VP2. Las células se infectaron con cada uno de los rearreglantes y a 7.5 horas post infección se realizó el marcaje de proteínas celulares con S^{35} .

En la figura 11 se resalta la migración de las proteínas VP7, VP1, VP2, las cuales, migran diferencialmente entre las cepas YM y RRV. La migración diferencial de la proteína VP7 permitió corroborar el resultado obtenido mediante la amplificación del gen 9 y el corte con la enzima de restricción Tth1111, que corta de manera específica la cepa RRV (Fig. 12).

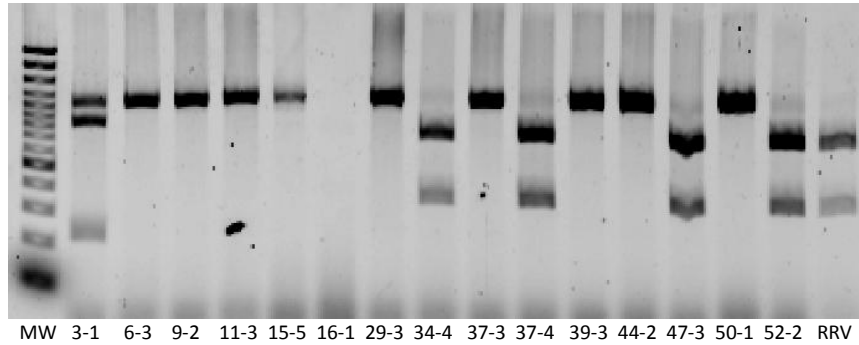


Fig. 12- **Corte del producto de PCR del gen 9 con la enzima Tth111I.** La enzima de restricción Tth111I corta de manera específica al gen 9 de la cepa RRV, pero no la cepa YM.

Una vez que logramos determinar el origen de cada segmento para cada rearreglante se, seleccionaron aquellas clonas que tuvieran combinaciones únicas para cada segmento génico y se infectaron células MA104 para obtener altos títulos virales.

Debido a la falta de clonas que tuviesen segmentos génicos 1, 2, 3, 4, 6 y 10 de RRV en el fondo genético de YM, se realizó una segunda ronda de co-infecciones, pero esta vez utilizando una MOI de 12 para RRV y de 3 para YM, a fin de favorecer la selección de rearreglantes con los segmentos génicos de RRV sobre los de YM. Al igual que en la primera selección, se eligieron 60 placas a las cuales se les extrajo el RNA y fue analizado en geles de poliacrilamida al 10%. Se seleccionaron las placas que mostraran un patrón de bandas diferente a las cepas parentales, realizándoseles además un re-plaqueo. De las clonas inicialmente elegidas durante la segunda co-infección y posterior re-plaqueo se seleccionaron 20 clonas con base en diferencias en la migración de sus segmentos génicos.

Para determinar el origen de los segmentos de cada rearreglante se realizó un marcaje metabólico de las proteínas sintetizadas en las células infectadas, para determinar el origen parental de cada gen mediante la migración de las proteínas codificadas por los genes 1, 2 y 9, además de tener en cuenta a los genes 4, 5 y 11, cuyo origen se puede determinar por migración del RNA en geles de poliacrilamida al 10%. Así mismo, se realizó el RT-PCR para los genes restantes 3, 6, 7, 8, 9 y 10.

Para verificar la asignación obtenida mediante geles de proteínas marcadas, se realizaron cortes en los productos de RT-PCTR de los genes 1, 2 y 9 de los rearreglantes de la segunda co-infección, dando como resultado una correcta correlación entre el origen de los segmentos determinados por corte del producto de RT-PCR y por la migración de las proteínas virales marcadas radiactivamente.

En la Tabla 3 se presenta el origen de los segmentos génicos de los nuevos rearreglantes, esta segunda selección permitió obtener clonas con los segmentos génicos 1, 2, 3, 4 y 6 de RRV en el fondo genético de YM, no obstante, continuamos careciendo de clonas con el gen 10 con rearreglo. La falta de rearreglantes en el segmento génico 10 quizás sea debido a la falta de análisis de una cantidad suficiente de rearreglantes que nos impide seleccionar clonas con este gen en particular. Al igual que en la primera selección, se observó que los rearreglantes obtenidos presentan en su mayoría un fondo genético de la cepa YM con uno o varios genes rearreglados de la cepa RRV.

Tabla 3. Rearreglantes seleccionados durante la segunda co-infección.

GENES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
VIRUS	VP1	VP2	VP3	VP4	NSP1	VP6	NSP3	NSP2	VP7	NSP4	NSP5/6
RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV
YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM
3-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM
3-5	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM
10-2	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV
10-3	RRV	RRV	YM	RRV	YM	RRV	RRV	YM	RRV	YM	YM
20-1	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM
20-2	YM	RRV	YM	RRV	YM	RRV	RRV	YM	RRV	YM	YM
26-1	RRV	RRV	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV	YM	YM
33-4	RRV	RRV	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV	YM	RRV
33-5	RRV	RRV	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV	YM	RRV
38-1	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM
38-3	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM
47-2	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM
48-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	YM	YM
48-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	YM	YM
50-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM
50-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM
58-1	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM
58-2	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	YM	YM
58-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	RRV	YM	RRV

Los genes de RRV están indicados en color verde y los de la cepa YM en azul.

En esta segunda selección se obtuvieron ocho nuevos rearreglantes con genes únicos y al igual que en los primeros rearreglantes, se observó una mayor capacidad de rearreglo del segmento génico 9 de la cepa RRV (Ver tabla 3). Sólo tres clonas poseen el gen 9 de la cepa YM, seis de los rearreglantes son monogénicas para el gen 9, rearreglantes monogénicos similares a éstos habían sido ya obtenidos en la co-infección anterior.

Entre las clonas obtenidas durante esta segunda selección se encontraron también: cuatro clonas con los genes 8 y 9, así como un rearreglante con los genes 7, 8, 9 y 11, uno con los genes 5 y 9, uno con el gen 3, uno con los genes 1, 2, 4, 6, 7 y 9, uno con los genes 1, 2, 6 y 9, dos con los genes 1, 2, 6, 9 y 11, uno con los genes 2, 4, 6, 7 y 9 y por último uno con los genes 6, 7, 8, 9, y 11, todas estas clonas presentan un fondo genético de YM y los genes mencionados corresponden a genes de RRV. La clona 10-3 es la única de todas las clonas analizadas que tienen el fondo genético de la cepa RRV y los genes 3, 5, 8, 10 y 11 de la cepa YM.

En la tabla 4 se muestra la proporción de los genes de la cepa RRV en los rearreglantes obtenidos, los cuales tienen un fondo genético de la cepa YM y fueron generados con diferente MOI en la co-infección. Como se observó, existe una selección preferencial en algunos segmentos génicos sobre otros, los genes 8 y 9 segregan más frecuentemente cuando se incrementa la cantidad de virus RRV en la co-infección, principalmente notorio para el segmento 9. Los segmentos génicos 5, 7 y 11, que fueron seleccionados durante la primera co-infección, no mostraron un aumento claro en su tendencia al rearreglo. Entre los rearreglantes seleccionados durante la segunda co-infección se observó un aumento en la cantidad de genes de RRV en las clonas seleccionadas, tal y como se muestra en la Tabla 4, esto muy probablemente debido a la estrategia de co-infección que se utilizó en la que se incrementó la cantidad de RRV.

Tabla 4. Relación de segmentos génicos derivados de RRV en los virus rearreglantes.

Na	MOI	Fracción del segmento génico										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
15	RRV 3: YM 3	SR	SR	SR	SR	0.2	SR	0.4	0.13	0.33	SR	0.13
19	RRV 12: YM 3	0.2	0.25	0.05	0.1	0.05	0.3	0.2	0.35	0.85	SR	0.2

Na= Número de rearreglantes analizados, SR= Genes sin rearreglo génico.

Estudios con rearreglantes en virus con genomas segmentados han demostrado que no todos los genes segregan independientemente y que ciertas constelaciones de genes parecen estar unidas genéticamente. Heiman *et al.*, estudiando 10 cepas de rotavirus encontraron que algunos presentan ciertas combinaciones de genotipos en sus proteínas. Analizando la secuencia de aminoácidos de 25 cepas de rotavirus humanos de los genotipos 1, 2 y 3, encontraron cambios específicos de cada genotipo, muchos de los cuales se encuentran en sitios de interacción proteína-proteína¹¹.

Entre las proteínas que han sido relacionadas por segregar juntas se encuentran NSP4 y VP6^{11, 13}. Como se mencionó anteriormente, durante la morfogénesis del virus las DLPs geman al interior del retículo endoplásmico, este proceso es mediado por la afinidad de la proteína de la capsida VP6 a la proteína NSP4, que forma complejos con VP7 en la membrana del RE a través de las cuales, las DLPs geman al interior del RE.

Durante este estudio no se obtuvieron rearreglantes de la proteína NSP4 (codificada por el segmento 10) quizás debido a que es una proteína multifuncional que interactúa no solo con VP6, sino que también interactúa con VP4, con la membrana de la célula hospedera y con proteínas celulares (tubulina, caveolina, calnexina, Proteína disulfuro isomerasa, etc.) durante la replicación viral, por lo tanto, las presiones de selección ejercidas sobre NSP4 no se encuentran limitadas a sus interacciones con proteínas virales^{3,11}.

Entre los rearreglantes obtenidos encontramos que ciertos genes presentan tendencia a segregar juntos, principalmente las que codifican para las proteínas VP1, VP2, VP6 y VP7. Esta tendencia podría estar determinada por las interacciones que tienen estas proteínas durante las etapas de morfogénesis del virus. Por ejemplo, la interacción de VP2 con VP1 mediante su extremo N-terminal, ya que se ha encontrado que esta unión es crítica para la síntesis de RNA (replicación y transcripción del genoma viral). Así mismo, VP2 interactúa también con VP6 durante etapas tempranas de la morfogénesis del virión, y esta interacción es esencial para la formación de las DLPs e influencia la capacidad transcripcional de la partícula¹¹.

El intercambio de proteínas en los rearreglos podría modificar las interacciones favorables, llevando en última instancia a cambios que modifiquen 1) el ensamblaje de VP6 sobre VP2, 2) la estabilidad de la DLP y 3) la capacidad transcripcional de VP1, la cual está mediada por VP2.

Aunque se ha propuesto la co-segregación genética de más proteínas, en este estudio no encontramos la tendencia de más genes a segregar juntos, aunque esto puede ser debido al bajo número de rearreglantes analizados.

McDonald *et al.*, estudiando la capacidad de transcripción entre rotavirus del grupo A y C encontró que las polimerasas (VP1) de estos grupos de virus tienen la capacidad de reconocer y replicar los RNAs de ambos grupos. Sin embargo, la expresión de las proteínas VP1 del grupo A y C con las proteínas VP2 A y C mostró que estas polimerasas sólo son activas con sus respectivas proteínas VP2, sugiriendo que las interacciones proteína-proteína de VP1 y VP2 pueden influenciar la supervivencia de cepas rearreglantes, lo cual es una de las limitantes para que ocurran rearreglos génicos entre rotavirus del grupo A y C¹⁹.

En la tabla 5 se muestran las clonas seleccionadas para la caracterización fenotípica, además de 5 clonas obtenidas previamente en el laboratorio por el Dr. Ernesto Méndez, dichas clonas tienen el fondo genético de la cepa RRV y los genes rearreglantes 4, 5, 8, 11 y 4-5 de la cepa YM. Estas clonas nos permitieron conocer si el cambio fenotípico observado con alguno de estos rearreglantes es recíproco cuando se intercambia el segmento génico en ambas cepas o si el cambio es dependiente del fondo genético en el que se encuentra el gen. También se muestran 17 de los rearreglantes obtenidos durante las dos co-infecciones y que tienen combinaciones específicas de uno o varios genes.

Tabla 5. Clonas utilizadas para la caracterización de fenotipos y genes con rearreglo.

GENES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
VIRUS	VP1	VP2	VP3	VP4	NSP1	VP6	NSP3	NSP2	VP7	NSP4	NSP5/6
RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV
YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM
5-5	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV
98-5	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV
99-2	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	YM
13-7	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV
13-4	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV
38-3	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM
11-3	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM	YM	YM
9-2	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM
38-1	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM
34-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM
29-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV
52-2	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM
37-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	RRV	YM	YM
48-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	YM	YM
47-3	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	RRV	YM	RRV	YM	YM
37-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV
10-3	RRV	RRV	YM	RRV	YM	RRV	RRV	YM	RRV	YM	YM
20-2	YM	RRV	YM	RRV	YM	RRV	RRV	YM	RRV	YM	YM
26-1	RRV	RRV	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV	YM	YM
33-5	RRV	RRV	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV	YM	RRV
58-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	RRV	YM	RRV
10-2	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV

Genes de RRV (verde), genes la cepa YM (azul)

Curva de crecimiento de los rotavirus YM y RRV

Se realizó una curva de crecimiento de las cepas parentales YM y RRV para determinar si existen diferencias en sus características de generación de progenie viral que permitan diferenciar fenotipos entre los rearreglantes obtenidos. Para ello se realizaron infecciones de células MA104 a una MOI de 1 de cada una de las cepas parentales en placas de 48 pozos y se tituló el virus presente en las células y en el sobrenadante a diferentes tiempos post-infección.

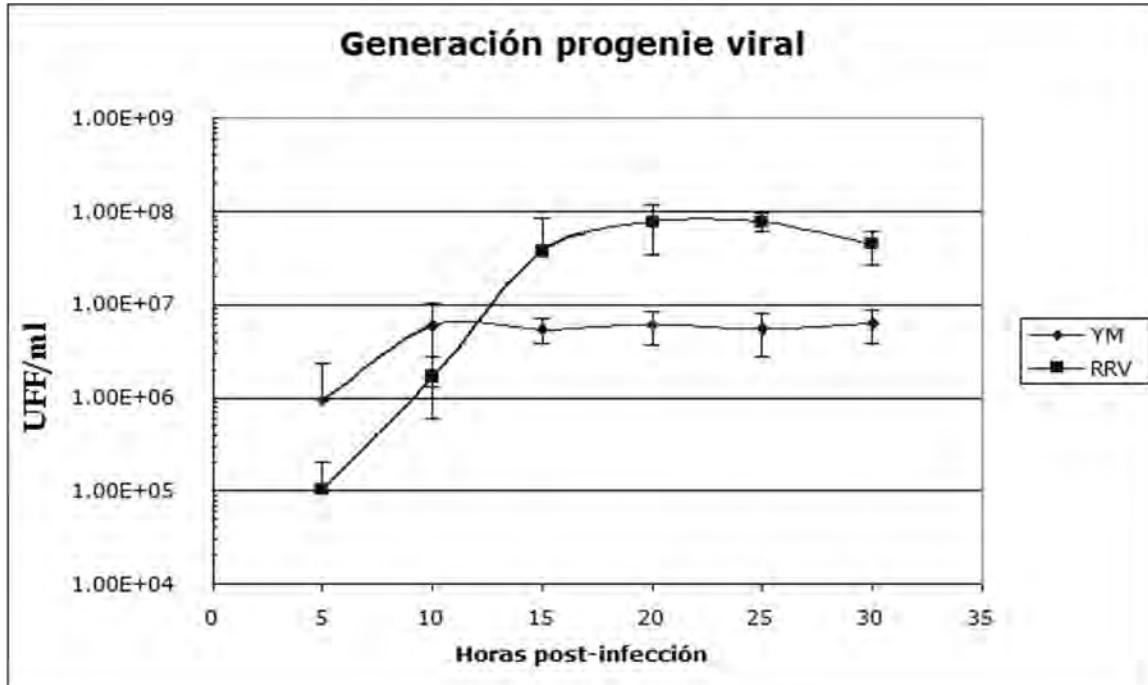


Fig. 13- Titulo de virus intracelular obtenido en células infectadas con YM o RRV y cosechados a los tiempos post-infección indicados.

En la figura 13 se muestra el resultado obtenido a partir de los virus presentes en las células a los diferentes tiempos post-infección. Los resultados obtenidos al titular los virus que se encontraron en el medio de cultivo a los diferentes tiempos fueron poco reproducibles, por lo que se decidió sólo titular el virus presente en las células. Cuando las células se infectaron con la cepa YM se observó la aparición de progenie viral a tiempos tempranos de la infección, llegando a un máximo a las 10 horas y permaneciendo constante de las 15 a las 30 horas post-infección; en cambio, al infectar células con la cepa RRV, la progenie viral infecciosa aumentó más lentamente que la cepa YM, alcanzando un máximo alrededor de las 20 horas post-infección. Sin embargo, la cantidad intracelular de virus RRV que se produjo llegó a ser hasta de un orden de magnitud mayor. Ramig encontró que al analizar la cinética de formación de rearreglantes entre dos cepas de rotavirus mutantes ts^{33} , la máxima frecuencia de rearreglos ocurre a tiempos tempranos de la infección, lo cual podría explicar en parte la tendencia hacia la selección de los segmentos génicos de la cepa YM en comparación con RRV. De hecho, con base en estos resultados se podría diseñar una nueva estrategia de co-infección, en la que se infectan las células con cada uno de los virus parentales a diferentes tiempos para obtener preferencialmente los genes de una cepa sobre otra.

Liberación de LDH durante la infección

Para determinar si esta limitante en la generación de progenie viral intracelular en la cepa YM era debida a una muerte celular más temprana causada por la infección de este virus en comparación con RRV, se midió la cantidad de LDH liberada al medio como una medida de la integridad celular en el transcurso de la infección. Para esto se infectaron células MA104 en placas de 96 pozos a una MOI de 1 y se determinó la cantidad de LDH liberado al medio mediante el kit TOX7-1KT (Sigma) a diferentes tiempos post-infección.

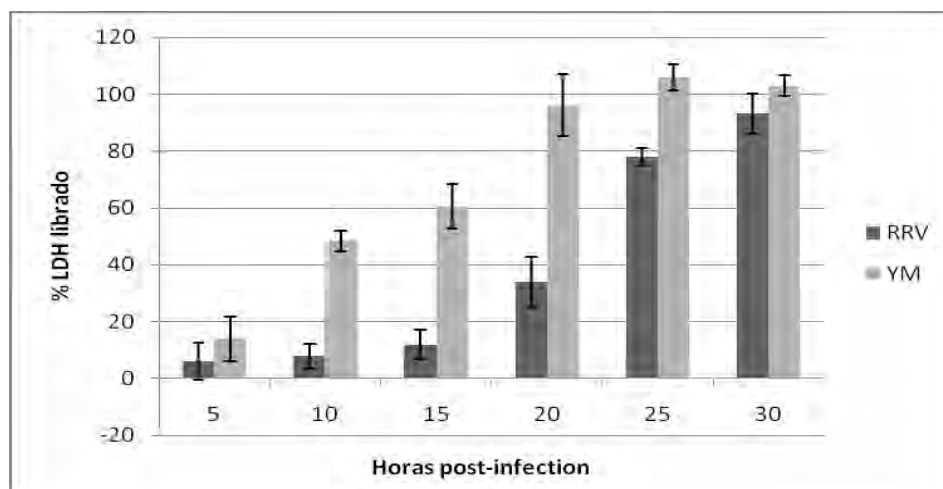


Fig. 14- Porcentaje de LDH liberado al medio durante la infección con rotavirus YM o RRV a distintos tiempos post-infección.

Encontramos que a las 10 horas post-infección se liberó al medio alrededor del 50% del LDH en las células infectadas con YM. En contraste, esta liberación de LDH se alcanza posterior a las 20 horas post-infección con RRV, lo que sugiere que hay una mayor lisis celular a tiempos más tempranos durante la infección por la cepa YM, lo cual podría ser una de las razones por las que esta cepa no alcanza títulos virales intracelulares más altos (Fig. 14).

A los datos de liberación de LDH obtenidos con las cepas parentales y los virus rearreglantes se les realizó un análisis de regresión no lineal, ajustada a una curva de dosis-respuesta, esto a fin de poder analizar todos los datos en su conjunto. Para ello se utilizó el programa Prisma 4.0 y se realizaron graficas para cada cepa rearreglante, tal y como se muestra con las cepas parentales (Fig. 15). Para definir a las cepas como “tipo RRV” o bien como “tipo YM” se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba Tukey (ver metodología). Se tomó el valor

de LogEC50 como medida de la tendencia de liberación de LDH durante la infección con cada virus rearreglante, los resultados se muestran en la tabla 6.

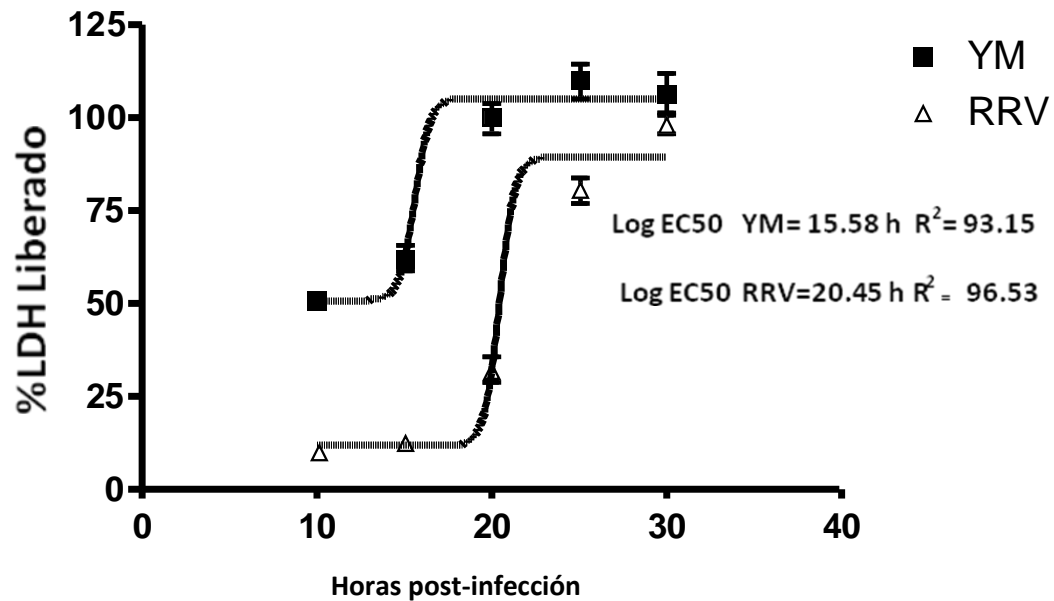


Fig. 15- Análisis de regresión no lineal de LDH liberado al medio durante la infección con YM o RRV.

En la tabla 6 se observan los resultados obtenidos con cada rearreglante, mostrándose en color el fenotipo de lisis celular al que corresponde cada virus. Se observa que en los rearreglantes monogénicos 13-7, 5-5, 98-5 y 99-2 con el fondo genético de la cepa RRV y los genes 4, 5, 8 y 11 de la cepa YM, respectivamente, no se modifica el fenotipo de muerte celular, ya que no hay diferencias significativas en comparación con la cepa parental RRV. En tanto que en la clona 13-4 que también tiene el fondo de RRV, pero tiene los genes 4 y 9 de YM, se observó un cambio en el fenotipo de lisis celular hacia un “tipo YM”, en este caso parece que la proteína VP7 o bien la combinación VP4-VP7 de YM en el fondo de RRV es capaz de modificar el fenotipo de lisis celular. Un cambio en las interacciones de las proteínas VP4 y VP7 podría modificar i) el ensamblaje de partículas infecciosas, ii) la estabilidad de la partícula en la naturaleza y iii) la eficiencia del desensamblaje después de la entrada a la célula hospedera⁴³, el modo el que estos genes de YM causan el cambio fenotípico de lisis celular necesita ser estudiado.

Tabla 6. Resumen de rearreglantes y tendencia de liberación de LDH al medio.

GENES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	LDH	P=0.05
VIRUS	VP1	VP2	VP3	VP4	NSP1	VP6	NSP3	NSP2	VP7	NSP4	NSP5/6		
RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	21.12	
YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	15.8	
5-5	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	24.9	
98-5	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV	24.3	
99-2	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	25.02	
13-7	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	24.9	
13-4	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	14.4	
38-3	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	20.35	
11-3	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM	YM	YM	14.5	
9-2	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM	14.9	
38-1	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	19.91	
34-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	15.9	
29-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	15.24	
52-2	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	14.8	
37-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	RRV	YM	YM	19.91	
48-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	YM	YM	15	
47-3	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	RRV	YM	RRV	YM	YM	19.6	
37-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV	15.2	
10-3	RRV	RRV	YM	RRV	YM	RRV	RRV	YM	RRV	YM	YM	19.61	
20-2	YM	RRV	YM	RRV	YM	RRV	RRV	YM	RRV	YM	YM	21.11	
26-1	RRV	RRV	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV	YM	YM	25.2	
33-5	RRV	RRV	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV	YM	RRV	24.8	
58-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	20	
10-2	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	16	

LDH: Tendencia a la liberación de LDH durante la infección con virus rearreglantes. P=0.05: Similitud fenotípica de cada cepa rearreglante con respecto a las cepas parentales YM (azul) o RRV (verde), determinada mediante análisis estadístico (ver metodología).

En los rearreglantes 11-3, 9-2, 37-3, 34-4 y 29-3 que tienen un fondo genético de YM y los genes 5, 7, 8-11, 9 y 11 de RRV respectivamente, no se modificó el fenotipo de lisis celular, siendo su fenotipo similar al de la cepa YM. Combinaciones con los genes 7-9, 8-9, 8-11, 5-7-9 y 6-7-8-9-11 de RRV en un fondo genético de YM, no afectaron el fenotipo de lisis celular observado en la cepa parental. Sorpresivamente, en la clona 38-3 que tiene el gen 3 (que codifica para la proteína VP3

que es la proteína con actividad de Guanililtransferasa) de RRV en el fondo genético de YM, se observó un cambio en el fenotipo de lisis celular. En las clonas 10-3, 20-2, 26-1, 33-5 con uno o varios genes rearrreglados de RRV que son componentes de la cápside del virus (proteínas VP1, VP2, VP3, VP6 y VP7), se observó una modificación en el fenotipo de lisis celular, aunque no se ha reportado que estos genes intervengan de manera directa en la muerte celular causada por los rotavirus.

La muerte celular causada por los rotavirus ha sido atribuida a la pérdida de la integridad celular, se ha determinado que al menos parte de este efecto es causado por alteraciones en la homeostasis celular de Ca^{2+} inducidas por la infección. Cuando se utilizan quelantes de calcio como el BAPTA en el citoplasma o se adiciona D600 (un inhibidor de los canales de calcio) se retrasa la muerte celular⁴⁷. El hecho de que la tunicamicina (inhibidor de la síntesis de glicoproteínas) inhiba el incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática al Ca^{2+} inducida por la infección, sugiere que una de las proteínas glicosiladas del virus (NSP4 y/o VP7) pudieran estar involucradas en este efecto. Mutantes de rotavirus deficientes en la glicosilación de VP7 revelan que la glicosilación de esta proteína no es necesaria para inducir los cambios de calcio que conlleva la infección viral⁴⁶, sin embargo, también se ha demostrado que cuando la proteína VP7 es silenciada por siRNAs se inhibe parcialmente el incremento en la permeabilidad al Ca^{2+} ⁴¹. NSP4 es considerada como la principal causante de la liberación de Ca^{2+} , ya que si se bloquea su expresión este efecto desaparece completamente. Así mismo, cuando NSP4 es expresada en células de insecto (Sf9) y en otras líneas celulares, se inducen cambios en la concentración de Ca^{2+} , lo cual ha sido interpretado como consecuencia de un incremento en la permeabilidad al Ca^{2+} en la membrana del RE, pero no en la membrana citoplasmática⁴⁷.

Se sabe que el calcio tiene un papel crucial en la apoptosis inducida por diferentes virus, por ejemplo, la apoptosis inducida por la proteína gp169 del HIV es mediada por un incremento intracelular de calcio; de manera similar, la apoptosis inducida por la proteína X del virus de la hepatitis B es marcadamente reducida por las alteraciones en la señalización de calcio⁴⁷. Aunque se sabe que la NSP4 es suficiente para llevar a cabo este efecto, el mecanismo definido es todavía desconocido.

Los resultados de este trabajo no permiten establecer claramente si la proteína VP7 y/o NSP4 son las responsables del fenotipo de lisis la celular en células infectadas con rearrreglantes.

Análisis del fenotipo de apagado de la síntesis de proteínas celulares

Como se mencionó anteriormente, durante la infección viral hay un severo apagado en la síntesis de proteínas celulares, el cual es mucho más evidente en la infección por el virus YM que en la del virus RRV. Para determinar el tiempo en el cual el fenotipo del apagado de la síntesis de proteínas es fácilmente diferenciable y determinar el o los genes responsables de este fenotipo, se infectaron células MA104 con las cepas parentales YM y RRV, y a diferentes tiempos post-infección se substituyó el medio de cultivo por MEM sin metionina suplementado con 25 μCi de metionina marcada con azufre (S^{35}), 30 minutos después las células fueron lisadas y estos lisados fueron analizados en geles de poliacrilamida al 10%. Los geles fueron posteriormente teñidos con solución coomassie para observar la carga de proteína en cada una de las muestras (Fig. 16 a). Posteriormente los geles se secaron y se expusieron a placas de rayos X para visualizar las proteínas marcadas con S^{35} (Fig. 16 b).

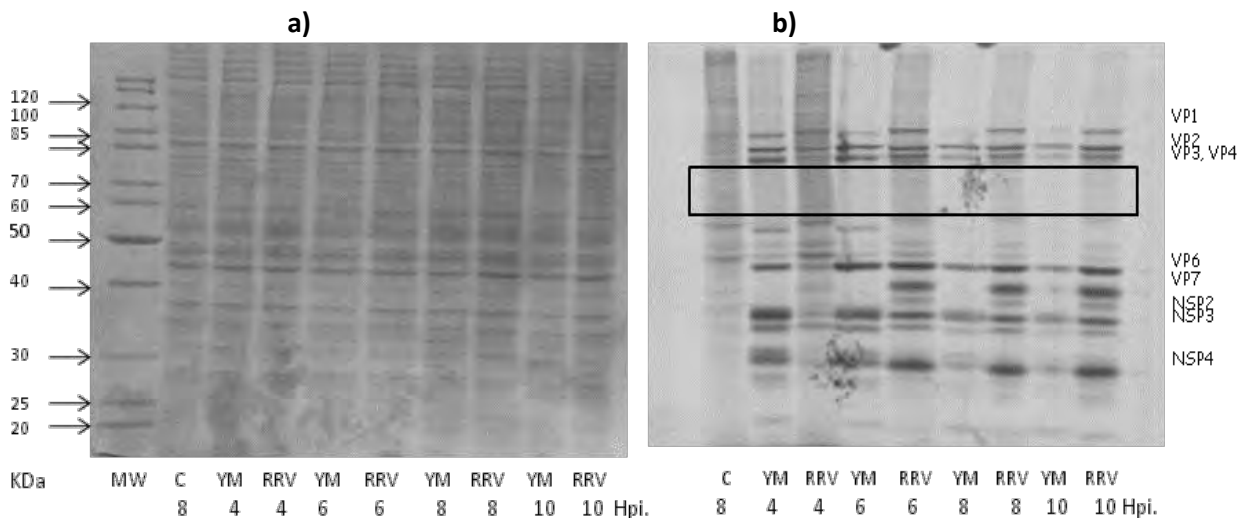


Fig. 16- **Marcaje metabólico de células infectadas con YM o RRV y proteínas teñidas con azul de coomassie.** a) proteínas teñidas con azul de coomassie y b) Autoradiografía del marcaje metabólico a diferentes tiempos de infección con los rotavirus YM y RRV, el recuadro indica el área de análisis de proteínas celulares. C= control de células sin infectar

Para determinar de manera cuantitativa la disminución en la síntesis de proteínas celulares, se realizó autoradiografía a los geles con proteínas marcadas y se eligió un área (recuadro en la Fig. 16 b) en la cual no estuvieran presentes las proteínas virales y que permitiera cuantificar el nivel de síntesis de proteínas celulares. Este procedimiento se realizó a diferentes tiempos de infección tanto de YM como de RRV, el área señalada se analizó por densitometria usando el programa phosphoroimager del Typhoon Trio™ Variable Mode Imager (Fig. 17).

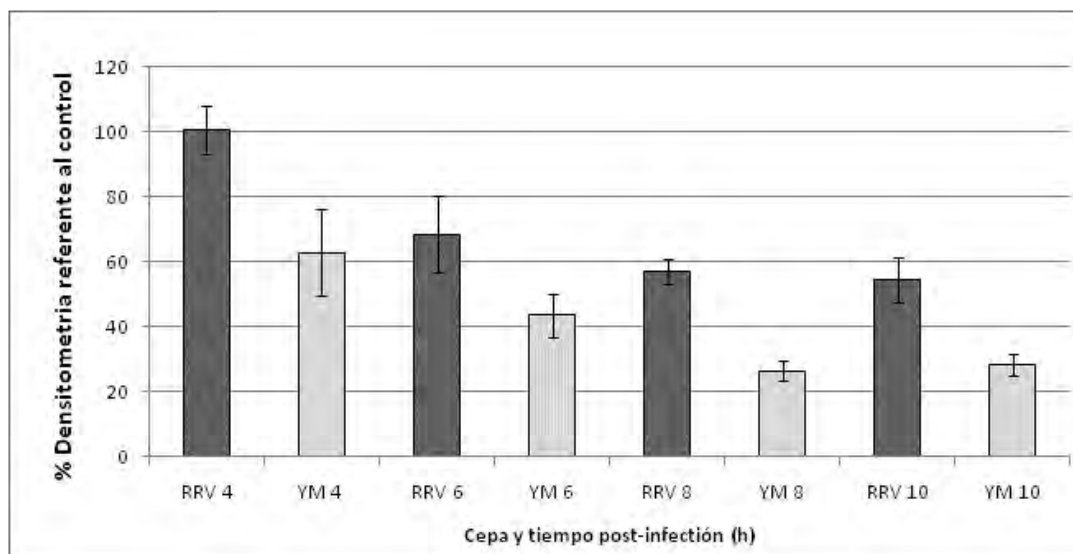


Fig. 17- Densitometría de proteínas celulares sintetizadas durante la infección con los rotavirus YM y RRV.

Como se puede observar, existe una buena correlación entre la disminución del fondo de proteínas celulares visualizados en el gel de la figura 16 (b) y los datos de la figura 17, en donde se observa una clara disminución en el fondo de proteínas celulares tanto en células infectadas con YM y RRV, alcanzando un máximo de inhibición para ambos virus a las 8 horas post infección y manteniéndose hasta las 10 horas, siendo además, el fondo celular durante la infección por RRV aproximadamente el doble que el presentado durante la infección por YM ya sea a las 8 ó 10 horas.

Síntesis de proteínas en células infectadas con los rearreglantes

Basado en los resultados anteriores, se infectaron células con cada uno de los rearreglantes a una MOI de 5 y se marcaron con un pulso (de S^{35}) media hora antes de ser cosechados a las 8 horas post-infección para determinar los fenotipos del apagado de la síntesis de proteínas celulares. En la tabla 7 se muestran los rearreglantes analizados y en el fenotipo de apagado de la síntesis de proteínas celulares determinados por densitometría, ambos fenotipos se muestran clasificados en color que indica el “tipo” de fenotipo ya sea YM (azul) o RRV (verde), que presenta cada cepa rearreglante. La asignación del “tipo de fenotipo” se realizó mediante análisis estadístico ANOVA de una vía y Tukey, ver metodología.

Tabla 7. Resumen de rearreglantes y fenotipo del apagado de la síntesis de proteínas celulares.

GENES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	% S ³⁵	P=0.05
VIRUS	VP1	VP2	VP3	VP4	NSP1	VP6	NSP3	NSP2	VP7	NSP4	NSP5/6		%S ³⁵
RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	56.27	
YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	23.15	
5-5	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	39	
99-5	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV	47.8	
99-2	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	68.89	
13-7	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	52.06	
13-4	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	22.05	
38-3	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	17.24	
11-3	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM	YM	YM	16.35	
9-2	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM	19.56	
38-1	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	29.75	
34-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	20.76	
29-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	25.4	
52-2	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	19.45	
37-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	RRV	YM	YM	18	
48-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	YM	YM	25.74	
47-3	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	RRV	YM	RRV	YM	YM	32.7	
37-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV	41.8	
10-3	RRV	RRV	YM	RRV	YM	RRV	RRV	YM	RRV	YM	YM	22.44	
20-2	YM	RRV	YM	RRV	YM	RRV	RRV	YM	RRV	YM	YM	30.12	
26-1	RRV	RRV	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV	YM	YM	4	
33-5	RRV	RRV	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV	YM	RRV	55.87	
58-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	21.64	
10-2	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	26	

% S³⁵ = Incorporación de S³⁵ a proteínas celulares sintetizadas durante la infección con rotavirus. P=0.05: Similitud fenotípica de cada cepa rearreglante con respecto a las cepas parentales YM (azul) o RRV (verde), determinada mediante análisis estadístico (ver metodología).

En el caso del fenotipo del apagado de la síntesis de proteínas celulares las clonas rearreglantes monogénicas que tienen el fondo genético de YM y los genes 3, 5, 7, 8, 9, 11 de la cepa RRV, así como las clonas con dos o más genes 7-9, 5-7-9, 8-9 y 7-8-9-11 de la cepa RRV en el

fondo genético de YM no modificaron el fenotipo de inhibición de la síntesis de proteínas celulares.

La clona 9-2 que tiene el gen 7 (proteína NSP3) de YM no mostró la capacidad de inducir un cambio en este fenotipo, aún y cuando se ha descrito la importancia de la proteína NSP3 en la inhibición de la síntesis de proteínas celulares²⁷; así mismo, se ha observado que cuando se inhibe la expresión de NSP3 mediante siRNAs en células infectadas por rotavirus el fondo celular se incrementa, demostrando una mayor síntesis de las proteínas celulares^{23, 24}. Este resultado sugiere que la proteína NSP3 de ambas cepas YM y RRV es intercambiable funcionalmente, sin embargo, NSP3 no determina por si sola, la severidad del apagado de la síntesis de proteínas celulares durante una infección por rotavirus. Se ha propuesto que la fosforilación del factor eIF2 α es, junto con NSP3, responsable de la inhibición de la síntesis de proteínas celulares, por lo que también se analizó el fenotipo de fosforilación de eIF2 (ver más adelante).

Observamos también que la clona rearreglante 37-3 que tiene los genes 8 y 11 (NSP2 y NSP5 respectivamente) de RRV en el fondo genético de YM fue capaz de modificar la síntesis de proteínas celulares, no así cuando estos mismos genes segregan de manera independiente (clonas 38-1 y 29-3). Las clonas 58-4 y 10-2 que poseen también entre sus genes rearreglados los segmentos 8 y 11 no muestran un cambio en el fenotipo, lo cual pudiera deberse a que alguna de las proteínas ya sea directa o indirectamente pueda enmascarar el cambio en el fenotipo.

Los rearreglantes con los genes 1, 2, 6 y 9 (proteínas VP1, VP2, VP6 y VP7, respectivamente) de RRV fueron los que mostraron mayor capacidad para modificar el fenotipo de inhibición de la síntesis de proteínas celulares. El hecho de que los rearreglantes monogénicos en el gen 9 no causen el cambio de fenotipo sugiere que el producto de los genes 1, 2 y 6 son los principales responsables de este efecto. Para definir específicamente que genes intervienen o no el cambio en este fenotipo es necesario el estudio de rearreglantes monogénicos. Los rearreglantes 10-3 y 20-2 que poseen rearreglo en los genes 1, 2, 4, 6, 7 y 9 no mostraron un cambio en el fenotipo de la inhibición en la síntesis de proteínas celulares, lo cual sugiere que los genes 4 y/o 7 de manera directa o indirecta impiden la modificación del fenotipo, la razón por la cual se enmascara un cambio fenotípico necesita ser estudiado.

Fosforilación del factor eIF2 durante la infección con rotavirus

Como se mencionó previamente en la introducción, en nuestro laboratorio se observó que durante el ciclo replicativo del rotavirus ocurre la fosforilación de eIF2 α^{22} y que el grado de fosforilación puede variar dependiendo la cepa que se utilice.

Para definir que gen o genes virales están involucrados en este fenotipo, se realizaron ensayos de Western blot a lisados de células infectadas con las cepas YM y RRV, así como a los rearreglantes obtenidos. El estado de fosforilación se determinó utilizando anticuerpos específicos dirigidos ya sea contra la forma fosforilada (anti-eIF2 α^P Ser-51) o total del factor eIF2, y cuantificando con un anticuerpo secundario acoplado a alexa 647 y midiendo la intensidad de la fluorescencia utilizando el Typhoon Trio™ Variable Mode Imager (Fig. 18). Para determinar el grado de fosforilación de eIF2 durante la infección con cada cepa parental o rearreglante, se analizó la relación de la cantidad de eIF2 fosforilada sobre la cantidad total de eIF2.

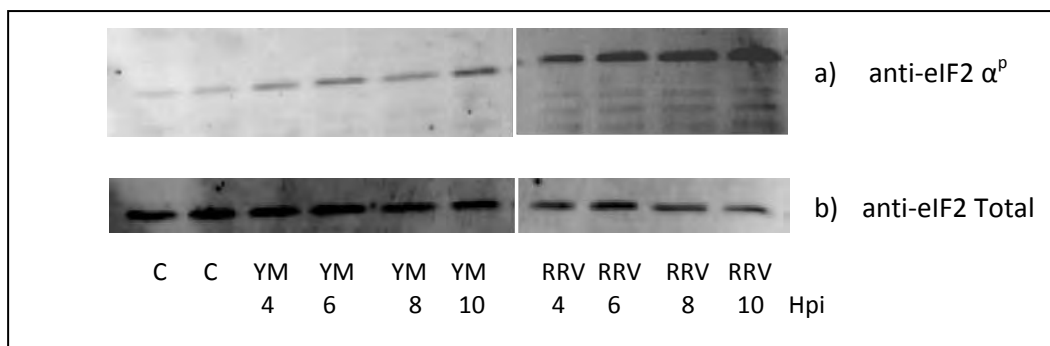


Fig. 18- Western blot contra eIF2 durante la infección por rotavirus a diferentes horas post-infección. a) Detección de forma fosforilada de eIF2 α -P, b) Detección de eIF2 total.

En la figura 18 se muestra la fosforilación del factor eIF2 α durante la infección por rotavirus a diferentes tiempos post-infección, siendo la cepa RRV la que induce una mayor cantidad de eIF2 α fosforilada con relación al eIF2 total y en comparación con la cantidad de eIF2 α fosforilada durante la infección con la cepa YM.

El estado de fosforilación del factor eIF2 α para cada una de las cepas rearreglantes se analizó a 8 horas post- infección (Fig. 19). Tal y como en los resultados anteriores, los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía y Tukey para determinar la similitud fenotípica de cada cepa

rearreglante con respecto a las cepas parentales YM o RRV, asignando como Tipo RRV o Tipo YM según su comportamiento.

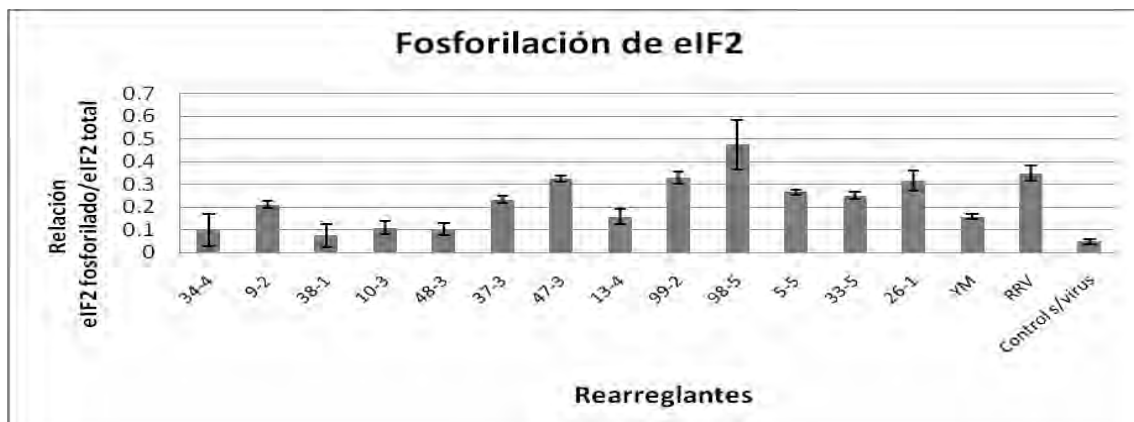


Fig. 19. Estado de fosforilación del factor eIF2 durante la infección por rotavirus a 8 Hpi.

Los resultados obtenidos al cuantificar el grado de fosforilación del factor eIF2 mostraron una gran variabilidad; en la figura 19 se muestran los rearreglantes para los cuales esta caracterización fenotípica fue más reproducible. Los rearreglantes que mostraron fenotipos “tipo RRV” (mayor relación eIF2 fosfo/total en comparación con YM) fueron las clonas 99-2, 98-5, 5-5, 26-1, 33-5, 37-3 y 47-3. Las clonas 99-2, 98-5 y 5-5 tienen un fondo genético de RRV y los genes rearreglantes 11, 8 y 5 de YM respectivamente, mostrando que dichos genes individualmente no influyen en el grado en el que los rotavirus inducen la fosforilación del factor eIF2, sugiriendo una escasa o nula participación. La clona 47-3 con un fondo genético de YM y los genes 5, 7 y 9 rearreglados de RRV, muestra a su vez un cambio en el estado de fosforilación a un “tipo RRV”, sin embargo, los rearreglantes monogénicos de los genes 7 y 9 no mostraron cambios en este fenotipo, así como ninguno de los fenotipos analizados anteriormente, sugiriendo que posiblemente la combinación de los genes 7 y 9 es necesaria para este cambio.

Las clonas 26-1 y 33-5 que presentan el fondo genético de la cepa YM y los genes rearreglados 1, 2, 6 y 9 de la cepa RRV, muestran un cambio en la capacidad de fosforilación del factor eIF2 a un “tipo RRV”, estos resultados al igual que en los fenotipos anteriores sugiere la participación de las proteínas VP1 (gen 1), VP2 (gen 2) y VP6 (gen 6) ya sea directa o indirecta en mantener o inducir el estado de fosforilación de eIF2 durante la infección por rotavirus. En la tabla 8 se muestra un resumen de los rearreglantes analizados, los fenotipos analizados de muerte celular, de apagado de la síntesis de proteínas celulares y del estado de fosforilación del factor eIF2 α .

Tabla 8. Resumen rearreglantes, tendencia a la liberación de LDH al medio, fenotipo del apagado de la síntesis de proteínas celulares y fosforilación del factor eIF2.

GENES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	LogEC50	% S ³⁵	P=0.05 %		eIF2 P/T	P=0.05 %
	VIRUS	VP1	VP2	VP3	VP4	NSP1	VP6	NSP3	NSP2	VP7	NSP4			NSP5/6	Log EC50		
RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	21.12	56.27			0.35	
YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	15.8	23.15			0.16	
5-5	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	24.9	39			0.27	
98-5	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV	24.3	47.8			0.47	
99-2	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	25.02	68.89			0.33	
13-7	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	RRV	24.9	52.06			ND	ND
13-4	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	RRV	14.4	22.05			0.16	
38-3	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	20.35	17.24			ND	ND
11-3	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM	YM	YM	14.5	16.35			ND	ND
9-2	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	YM	14.9	19.56			0.21	
38-1	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	YM	19.91	29.75			0.08	
34-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	15.9	20.76			0.1	
29-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	15.24	25.4			ND	ND
52-2	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	14.8	19.45			ND	ND
37-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	RRV	YM	YM	19.91	18			ND	ND
48-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	YM	YM	15	25.74			0.1	
47-3	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	RRV	YM	RRV	YM	YM	19.6	32.7			0.32	
37-3	YM	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV	15.2	41.8			0.23	
10-3	RRV	RRV	YM	RRV	YM	RRV	RRV	YM	RRV	YM	YM	19.61	22.44			0.11	
20-2	YM	RRV	YM	RRV	YM	RRV	RRV	YM	RRV	YM	YM	21.11	30.12			ND	ND
26-1	RRV	RRV	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV	YM	YM	25.2	4			0.32	
33-5	RRV	RRV	YM	YM	YM	RRV	YM	YM	RRV	YM	RRV	24.8	55.87			0.25	
58-4	YM	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	20	21.64			ND	ND
10-2	YM	YM	YM	YM	YM	RRV	RRV	RRV	RRV	YM	RRV	16	26			ND	ND

LDH= Tendencia a la liberación de LDH durante la infección con virus rearreglantes. % S³⁵= Incorporación de azufre marcado a proteínas celulares sintetizadas durante la infección con rotavirus. eIF2 P/T= Relación del factor eIF2 fosforilado y total. P=0.05: Similitud fenotípica de cada rearreglante con respecto a YM (azul) o RRV (verde), determinada mediante análisis estadístico. ND= No determinado

En este estudio observamos que cierto intercambio de genes favorece la modificación de uno o varios fenotipos analizados, principalmente aquellos rearreglos que se dan entre las proteínas estructurales del rotavirus, siendo principalmente notorio el caso de los genes 1, 2, 3, 6 y 9 cuando éstos co-segregan o en el caso de VP3 cuando segrega de manera independiente. Esto podría ser explicado en parte, debido a la gran interacción entre las proteínas codificadas por estos genes, tal es el caso de la proteína estructural VP2, la cual interactúa con la RNA dependiente RNA polimerasa (VP1) y con la Guaniltransferasa (VP3), se sabe que estas interacciones son críticas para los procesos de replicación y transcripción del genoma de los rotavirus. La proteína VP2 interactúa con la proteína VP6, dicha interacción es esencial para la formación de DLPs e influyen la capacidad transcripcional de la partícula¹¹. Libersou *et al.*, estudiando modelos de VP6 en las TLPs y modelos de ensamblaje de VP2/6, VP2/6/7, VP6 y VP6/7, encontraron que VP7 lleva a la reorientación de los trímeros de VP6 alrededor del eje y contrae el diámetro del canal tipo I, provocando una mejor organización de la partícula, siendo este efecto más notable cuando VP2 está presente. Esta reorganización en la estructura de VP6 impuesta por VP7 sugiere que modificaciones estructurales constituyen un regulador potencial para la actividad transcripcional de las partículas de rotavirus¹⁶. La co-segregación de la proteína VP2 con las proteínas VP1, VP6 y VP7 en los rearreglantes y los resultados obtenidos sugieren que los cambios fenotípicos podrían ser el resultado de modificaciones que afectan la estructura de la partícula, aunque se ha observado en el caso de Influenza que la proteína PB1 del complejo de polimerasa tiene la capacidad de modificar la virulencia²⁹, no obstante, son necesarios más estudios para determinar específicamente qué gen es el responsable de estos fenotipos o si se necesita la co-segregación de estos genes en particular y posteriormente estudiar el mecanismo con el que estas proteínas inducen la fosforilación del factor eIF2 y la inhibición en la síntesis de proteínas celulares.

La co-segregación de las proteínas NSP2 y NSP5 (codificado por los genes 8 y 11) resulta también en la modificación de los fenotipos de apagado de la síntesis de proteínas celulares o en la fosforilación del factor eIF2. Como se mencionó en la introducción, las proteínas NSP2 Y NSP5, (codificada por los genes 8 y 11, respectivamente) se unen al RNA y se ha propuesto que podrían contribuir a la acumulación del mRNA dentro de los viroplasmos y así llevar a cabo la replicación²⁸. Estas proteínas son cruciales para la formación de viroplasmos y para que se lleve a cabo el ciclo

replicativo, no obstante, el sistema de rearrreglos no permite determinar qué función tienen estas proteínas en la inducción o modificación de estos fenotipos.

Debido a que aún no se ha desarrollado un sistema de genética reversa eficiente para el estudio de los rotavirus, el sistema de rearrreglos génicos representa una valiosa herramienta, no obstante sus limitaciones en cuanto al número de fenotipos que pueden ser analizados o la problemática de la obtención de cepas rearreglantes, este sistema permite obtener datos funcionales de proteínas virales en el contexto del ciclo replicativo y de la patogénesis durante una infección viral.

CONCLUSIONES

1. El fenotipo viral de apagado de la síntesis de proteínas celulares es complejo y parece estar dado por más de un gen viral.
2. Los genes 4 y 9 de YM (VP4 y VP7, respectivamente) en el fondo de RRV son capaces de inducir un cambio fenotípico con respecto a las características analizadas de liberación de LDH, de apagado en la síntesis de proteínas celulares y del grado de fosforilación de eIF2, siendo similares a la cepa YM.
3. El gen 3 de RRV (proteína VP3) es capaz de modificar el comportamiento de lisis celular en la cepa YM, hacia un fenotipo tipo RRV.
4. Los rearreglantes monogénicos en los genes 5, 7, 9 y 11 de RRV en el fondo de YM no modifican los fenotipos analizados cuando segregan de manera individual.
5. La co-segregación de los genes 8 y 11 de RRV en el fondo génico de YM son necesarios para inducir el cambio en el apagado de la síntesis de proteínas celulares y modificar el estado de fosforilación de eIF2 haciéndolos parecidos a la cepa RRV.
6. Los virus rearreglantes en los genes 1, 2, 3 y 6 (VP1, VP2, VP3 y VP6, respectivamente) de RRV en el fondo genético de la cepa YM tienen la capacidad de modificar los fenotipos analizados, haciéndolos parecidos a la cepa RRV.

PERSPECTIVAS

1. Estudiar el papel que tiene la proteína VP3 de RRV en el proceso de lisis celular en el fondo genético de YM.
2. Determinar si existen cambios estructurales entre las cepas rearreglantes de las proteínas VP1, VP2, VP6 y VP9 que expliquen el cambio fenotípico en la cepa YM a un “tipo RRV”.
3. Estudiar la relación existente entre las proteínas estructurales VP1, VP2, VP6 y las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5, con el estado de fosforilación del factor eIF2.

REFERENCIAS

1. ARIAS, C.F., DECTOR M.A., SEGOVIA, L., LOPEZ, T., CAMACHO, M., ISA, P., ESPINOSA, R. AND LOPEZ, S. (2004) RNA silencing of rotavirus gene expression, *Virus research* 102: 43-51
2. ARNOLDI, F., CAMPAGNA, M., EICHWALD, C., DESSELBERGER, U. AND BURRONE, O. R. (2007). Interaction of Rotavirus Polymerase VP1 with Nonstructural Protein NSP5 Is Stronger than That with NSP2. *J. Virol.* 81 (5): 2128-2137.
3. BALL, J., MITCHELL, D., GIBBONS, T. AND PARR R. (2005) Rotavirus NSP4: A Multifunctional Viral Enterotoxin. *Viral Immunol.* 18(1):27-40.
4. BUSHELL, M. AND SARNOW, P. (2002) Hijacking the translation apparatus by RNA virus. *The J. of Cell Biology.* 158: 395-399-
5. CHEN, D., BURNS, J., ESTES, MK. AND RAMIG RF. (1989) Phenotypes of rotavirus reassortants depend upon the recipient genetic background. *Proc. Natl. Acad. USA*, 86: 3743-3747
6. CHNAIDERMAN, J., BARRO, M. AND SPENCER E. (2002) NSP5 Phosphorylation regulates the fate of Viral mRNA in rotavirus infected Cells. *Arch. Virol.* 147: 1899-1911.
7. DENNEHY, P. (2008) Rotavirus Vaccines: an Overview. *Clin. Microbiol. Rev.* 21: 198-208
8. GALE, M., SENG-LAI, T. AND KATZE, M.G. (2000) Translational Control of Viral Gene Expression in Eukaryotes. *Microb. Molec. Biol. Rev.* 64 (2): 239-280
9. GOMBOLD, J.L., RAMIG, R.F. (1986) Analysis of Reassortment of Genome Segments In Mice Mixedly Infected With Rotaviruses SA11 And RRV. *J. Virol.* 57 (11): 110-116
10. GRAFF, J.W., ETTEYEBI, K. AND HARDY M.E. (2009) Rotavirus NSP1 inhibits NFkB activation by inducing proteasome –dependent degradation of b-TrCP: A novel mechanism of INF Antagonism. *Plos pathogens* vol 5: e1000280
11. HEIMAN E., MCDONALD, S., BARRO, M., TARAPOREWALA, Z., BAR-MAGEN, T. AND JOHN T. PATTON. (2008) Group A human rotavirus genomics: evidence that gen constellations are influenced by viral protein interactions. *J. virol.* 82: 11106-11116
12. ITURRIZA-GÓMARA, M., ISHERWOOD, B., DESSELBERGER, U. AND GRAY J. (2001) Reassortment in Vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995-1999. *J. Virol.* 3696-3705
13. ITURRIZA-GOMARA M., ANDERTON E., KANG G., GALLIMORE C., PHILLIPS W., DESSELBERGER U., AND GRAY J. (2003) Evidence for Genetic Linkage between the Gene

Segments Encoding NSP4 and VP6 Proteins in Common and Reassortant Human Rotavirus Strains. *J. clinical microbial* 41, 8:3566-3573.

14. KNIPE, D.M. and HOWLEY, P. M. Rotavirus and their replication Fields in *Virology*, Vol. (2) 4^a Edition, 2001 by LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS. Page. 1747-1833
15. LAIRD, A.R., RUIZ-PALACIOS, G., GUERRERO, M.L., GLASS, R.I. AND GENTSCH, J.R. (2003) Unexpected detection of animal VP7 genes among common rotavirus strains isolated from children in Mexico. *J. Clinical Microbiology*. VOI41, No. 9: 4400-4403.
16. LIBERSOU, S., SIEBERT, X., OULDALI, M., ESTROZI, F., NAVAZ, J., CHARPILLENNE, A., GARNIER, P., PONCET, D. AND LEPAULT, J. (2008) Geometric Mismatches within the Concentric Layers of Rotavirus Particles: a Potential Regulator Switch of Viral Particle Transcription Activity. *J. Virol.* 82: 2844-2852.
17. LOPEZ, T., ROJAS, M., AYALA-BRETON C., LOPEZ, S. AND ARIAS, C. F. (2005) Reduced Expression of the Rotavirus NSP5 Gene Has a Pleiotrópico Effect on Virus Replication. *J. Gen. Virol.* 86: 10609-17
18. LOPEZ, T., CAMACHO, M., ZAYAS, M., NAJERA, R., SANCHEZ, R., ARIAS, C.F AND LOPEZ, S. (2005) Silencing the morphogenesis of Rotavirus. *J Virol.* 79: 184-192.
19. McDONALD, S., AGUAYO, D., GONZALEZ-NILO, F. AND PATTON J. (2009) Shared and Group-Specific Features of the rotavirus RNA polymerase Reveal Potential determinants of Gene Reassortment Restriction. *J. Virol.* 83: 6135-6148
20. MIR, M.A AND PANGANIBAN A.T. (2008). A protein that replaces the entire cellular eIF4F complex. *The EMBO Journal.* 27: 3129-3139.
21. MOHAN, V. K., MULLER, J., AND ATREYA, C. D. (2003) The N- and C-Terminal Regions of Rotavirus NSP5 are the Critical determinants for the Formation of Viroplasm-Like structures Independent of NSP2. *J. Virol.* 77 (22): 12184-12192
22. MOHR, IAN. (2006) Phosphorylation and desphosphorylation events that regulate viral mRNA translation. *Virus research* 119: 89-99.
23. MONTERO, H., ARIAS, C. F. AND LOPEZ S. (2006) Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for Viral Protein Synthesis. *J. Virol.* 80 (18): 9031-9838
24. MONTERO, H., ROJAS, M., ARIAS, C. F. AND LOPEZ S. (2008) Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2 α , but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* 82 1496-1504
25. MOSSEL, E.C. AND RAMIG R.F. (2002) Rotavirus genome segment 7 (NSP3) is a determinant of extraintestinal spread in the neonatal mice. *J. Virol.* 76: 6502-6509

26. NIBERT, M.L., MARGRAF, R.L. AND COOMBS K.M. (1996) Nonrandom segregation of parental alleles in reovirus reassortants. *J. Virol.* 70,10. 7295-7300
27. PADILLA-NORIEGA, L., PANIAGUA, O. AND GUZMAN LEON S. (2002) Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology* 298: 1-7
28. PATTON, J.T., VASQUEZ DEL CARPIO, R., TORTORICI M.A., AND TARAPOREWALA, Z. (2007) Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. *Adv. in virus research* 69: 167-201.
29. PAPPAS, ET AL. (2008) single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *PNAS* 105: 3064-3069
30. PEREZ-VARGAS, J., ISA, P., LOPEZ, S. AND ARIAS C.F. (2005) Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America- Risks and benefits. *Archives of Medical Research* 37: 1-10
31. PROUD, CHRISTOPHER G. (2005) eIF2 and the control of cell physiology. *Seminars in cell & developmental biology* 16:3-12
32. RAINSFORD, E.W. AND McCRAE. (2007) Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. *Virus Research* 130: 193-201.
33. RAMIG, R. F. (1983a) Factors that affect genetic interaction during mixed infection with temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11. *Virology* 127: 91-99
34. RAMIG, R. F. (1997) Genetics of the rotaviruses. *Annul. Rev. Microbiol.* 51:225-55
35. RAMIG, R. F. (2004) Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *J. Virol.* 78 (19): 10213-10220.
36. RUIZ, A.M., LOPEZ, I.V., LOPEZ, S., ESPEJO, R.T., AND ARIAS, C.F. (1988). Molecular and Antigenic Characterization of Porcine Rotavirus YM, A Possible New Rotavirus Serotype. *J. Virol.* 62 (11): 4331-4336
37. ROJAS M. (2010) Caracterización de los mecanismos que utiliza rotavirus para mantener la fosforilación del factor eIF2.α. *Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas*. Instituto de Biotecnología, UNAM
38. SCHNEIDER, R., AND MOH I. (2003) Translation initiation and viral tricks. *Trends in Biochemical Sciences.* 28: 130-136.
39. SILVESTRI, L.S., TORTORICI, M.A., VASQUEZ DEL CARPIO R. AND PATTON J. (2005) Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. *J. Virol.* 79: 15165-15174.

40. SMITH ET AL. (2006) Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response. *J. Virol.* 80: 2019-2033.
41. TANIGUCHI, K. AND UROSAWA S. (1995) Diversity in rotavirus genomes. *Seminars In virology* 6: 123-131
42. UMES, D. P., HUMMELMAN E., BRESSE, J, S., MILLER, M.A. AND GLASS R.I. (2003) Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children and severe childhood diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 9, No. 5
43. UMES, D. P., GILBOS, C., BRESSE, J, S. AND GLASS R.I. (2006) Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 12, No. 2:304-306
44. VENTOSO, I., SANZ, M.A., MOLINA, S., BERLANGA, J.J., CARRASCO, L. AND ESTEBAN M. (2006) Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2 α phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes and development* 20: 87-100
45. VESIKARI, T. (1997) Rotavirus Vaccines against Diarrheal Disease. *The Lancet* 350: 1538-1541
46. YULEIMA DIAZ, ET AL. (2008) Expression of Nonstructural Rotavirus Protein NSP4 Mimics Ca^{2+} Homeostasis Changes Induced by Rotavirus Infection in Cultured Cells. *J. Virol*, Vol. 82, No. 22 p. 11331–11343
47. ZAMBRANO, ET AL. (2008) Silencing of NSP4 or VP7 expression reduces alterations in Ca^{2+} homeostasis induced by infection of cultured cells. *J. Virol.* 82: 5815-5824