



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Caracterización de la infección de rotavirus en células MA104
estimuladas con IFN tipo I y evaluación de la permisividad de
distintas líneas celulares a la infección.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q.F.B. Juan Manuel Carreño Quiroz

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Susana López Charreton (IBT-UNAM)

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

**Dra. Leonor Pérez Martínez (IBT-UNAM)
Dr. Ramón González García Conde (FC-UAEM)**

CUERNAVACA, MORELOS

Enero, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COMITÉ JURADO

Dra. Susana Castro Obregón (IFC-UNAM)

Dra. Marcela Lizano Soberón (IIB-UNAM)

Dra. Denhi Schnabel Peraza (IBT-UNAM)

Dr. Martin Gustavo Pedraza Alva (IBT-UNAM)

Dr. Baltazar Becerril Luján (IBT-UNAM)

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Virología del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos), bajo la tutoría de la Dra. Susana López Charreton. Este proyecto se realizó con financiamiento de DGAPA-UNAM (IN211411-3) y SEP-CONACYT (153639). El alumno recibió una beca de CONACYT durante la realización de su proyecto de maestría (No. de apoyo 323115).

Agradecimientos:

A la Dra. Susana López Charreton por su asesoría durante la realización de este proyecto y por sus críticos comentarios.

A los miembros de mi comité tutorial por la revisión y corrección de esta tesis.

Al Dr. Gustavo Martínez Delgado por su invaluable apoyo en el desarrollo de este trabajo y por sus apreciables consejos.

A los doctores Tomas López, Pavel Isa y Carlos Arias por sus comentarios críticos durante seminarios y trabajo de laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo y colaboración. En especial a Cinthia Martínez por hacer que los días en el laboratorio fueran muy divertidos.

A mi familia y amigos quienes hacen que todo lo que hago valga la pena.

“Viruses are the most abundant, diverse and rapidly evolving pathogens that the host immune system is challenged by and they therefore represent a serious threat to human health”

Bowie and Unterholzner, 2008.

ÍNDICE

Índice	I
Resumen	II
I. Introducción	1
1.1 Rotavirus: clasificación y estructura.....	1
1.2 Patogénesis.....	2
1.3 Ciclo replicativo.....	3
1.4 Respuesta antiviral.....	6
1.4.1 Mecanismos celulares de reconocimiento viral.....	6
1.4.2 Estructura y función de los interferones.....	8
1.4.3 Señalización inducida por interferones.....	8
1.4.4 Actividad antiviral de genes estimulados por interferón.....	10
1.5 Mecanismos de rotavirus para evadir la respuesta inmune innata.....	11
II. Justificación	12
III. Hipótesis	14
IV. Objetivos	14
V. Esquema metodológico	15
VI. Materiales y métodos	16
6.1 Líneas celulares, anticuerpos y reactivos.....	16
6.2 Cepas virales.....	16
6.3 Determinación del título viral.....	17
6.4 Purificación de partículas de doble capa (DLPs) y RNAdc.....	17
6.5 Lipofección de DLPs, transfección de plásmidos y RNAdc.....	18
6.6 Marcaje radiactivo de proteínas.....	18
6.7 Western blot.....	19

VII. Resultados	20
7.1 Efecto de interferón tipo I en la infectividad de rotavirus de la cepas RRV y UK en células MA104 y HUH 7.5.1.....	20
7.2 Infectividad de rearreglantes y variantes de rotavirus en células estimuladas con IFN tipo I.....	27
7.3 Determinación del título de rotavirus de las cepas RRV y UK en distintas líneas celulares.....	34
7.4 Lipofección de partículas virales de doble capa en células poco permisivas a la infección.....	35
7.5 Lipofección de partículas virales de doble capa en la línea celular HUH 7.5.1.....	36
7.6 Cinética de replicación de rotavirus en células HUH 7.5.1.....	38
7.7 Evaluación de síntesis de proteínas en células HUH 7.5.1 infectadas con rotavirus.....	40
7.8 Evaluación de la fosforilación de eIF2- α en células HUH 7.5.1 infectadas con rotavirus.....	41
7.9 Evaluación de la actividad del sistema 2'5'-OAS/RNasa L en células HUH 7.5.1.....	43
VIII. Discusión	45
IX. Conclusiones	53
X. Perspectivas	54
XI. Referencias	55

Resumen

Los interferones (IFN) representan un componente crítico en la resolución de infecciones virales. Aunque se ha demostrado que algunas cepas de rotavirus poseen mecanismos para bloquear la producción de IFN; una cantidad significativa de esta molécula antiviral es producida durante la infección con distintas cepas de rotavirus en varios modelos. Además, se ha demostrado en varios estudios *in vivo*, que en ratones los interferones restringen la replicación y el rendimiento viral.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de IFN en la restricción de la infección con rotavirus. Al estimular células MA104 con IFN tipo I se encontró que la cepa bovina de rotavirus (UK), es sensible a la estimulación de las células con IFN, a diferencia de la cepa de rotavirus de simio (RRV), la cual fue escasamente afectada por el tratamiento. Mediante la transfección de partículas virales de doble capa (DLPs), que carecen de las proteínas de capa externa VP4 y VP7 pero son transcripcionalmente activas (y por lo tanto al transfectarlas son capaces de iniciar una infección productiva), se encontró que una de las proteínas de capa externa es la responsable del fenotipo de resistencia a IFN, ya que en estas condiciones RRV resultó ser sensible a IFN, con alrededor de 90% de disminución en la infectividad.

Empleando rearreglantes entre los virus RRV y UK, se determinó que la proteína VP4 de la cepa RRV es probablemente la responsable del fenotipo de resistencia a IFN; ya que se encontró una correlación directa con el gen 4 de RRV, el cual codifica a la proteína VP4. También se evaluó el efecto de IFN sobre las variantes Nar3, Nar14 y Nar18, la cuales se derivan de RRV, pero tienen mutaciones puntuales en el gen de VP4 lo cual les confiere resistencia (*nar3*) o sensibilidad (*nar 14* y *nar 18*) al tratamiento de las células con neuraminidasa (NA). Se encontró que estas tres variantes son sensibles a IFN a diferencia de la cepa parental RRV, lo cual sugiere que alguna de las mutaciones en común posiblemente les confiere este fenotipo, que es independiente de su susceptibilidad al tratamiento con NA.

Adicionalmente, en este trabajo se demostró que la línea celular HUH 7.5.1 es altamente permisiva a la infección una vez que rotavirus ha pasado la fase de entrada. Con la finalidad de caracterizar los factores determinantes de esta alta permisividad, se evaluaron dos sistemas antivirales: la actividad de PKR y la actividad de RNasaL. En el caso de PKR, se encontró que el factor eucariote de inicio de la traducción ($eIF2\alpha$) no se fosforila en células HUH 7.5.1, muy probablemente debido a que esta línea celular expresa bajos niveles de PKR.

Con respecto a la actividad de RNasa L, no se detectó la degradación de RNAs ribosomales en la línea celular HUH 7.5.1 al transfectarla con RNAdc, a diferencia de la línea celular MA104. Este hallazgo indica que el sistema 2'5-OAS/RNasa L no se encuentra activo en la línea celular HUH 7.5.1. Durante la realización de este proyecto, otro grupo de investigación reportó que esta línea celular no expresa RNasa L, lo cual explica la falta de actividad de este sistema antiviral.

I. Introducción

1.1 Rotavirus: Clasificación y estructura

Los rotavirus son el principal agente causal de diarrea severa en niños y neonatos, y son responsables de más de 500,000 muertes por año a nivel mundial, la mayoría en países en vías de desarrollo [Parashar et al., 2010]. Estos virus se clasifican en 7 grupos diferentes (A-G) de acuerdo a su diversidad antigénica. La mayoría de las infecciones causadas por rotavirus son producidas por cepas del grupo A [revisado en Estes et al., 2007].

Estos virus pertenecen a la familia Reoviridae, poseen un genoma compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena con longitudes que varían desde 660 a 3300 pares de bases. Su genoma se encuentra confinado en una cápside con simetría icosaédrica formada por tres capas concéntricas de proteína [revisado en Arias et al., 2004 y Estes et al., 2007].

La capa interna del virus está compuesta por 120 moléculas de la proteína VP2, que rodea al genoma viral cuyo tamaño total es de 18,500pb. En el núcleo de la partícula viral se encuentran doce copias de VP1, la RNA polimerasa y de VP3 la guanililtransferasa. La capa intermedia, consta de 260 trímeros de VP6, que cubre a VP2 y forma lo que se conoce como partículas de doble capa (DLPs por sus siglas en inglés), las cuales son transcripcionalmente activas. La capa externa está formada por 60 trímeros de la proteína VP4 y 780 copias de la glicoproteína VP7 organizada en trímeros. La partícula madura mide aproximadamente 100nm de diámetro, presenta en su superficie 132 poros que funcionan como canales que permiten el flujo de componentes en solución acuosa hacia el interior de la cápside y el flujo hacia el exterior de los RNA mensajeros recién formados [revisado en Estes et al., 2007] (**Fig. 1**).

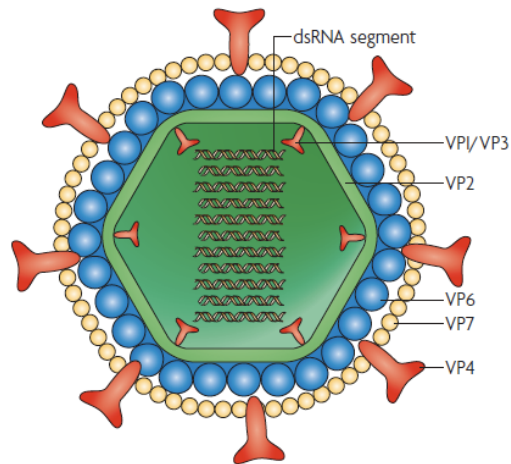


Figura 1. Representación esquemática de una partícula de rotavirus. Este virus está compuesto por seis proteínas estructurales, las cuales forman tres capas concéntricas. La capa interna envuelve al genoma compuesto por once segmentos de RNA de doble cadena, y contiene a la proteína de andamiaje VP2, a la RNA polimerasa dependiente de RNA VP1 y a la guanilil-metil transferasa VP3. La capa intermedia está compuesta por VP6, la proteína estructural más grande. La capa externa está formada por la glicoproteína VP7 y está decorada con espículas de la proteína VP4 (Tomado de Angel et al., 2007).

1.2 Patogénesis

Rotavirus infecta a los enterocitos maduros del epitelio intestinal. Los cambios patológicos causados por este virus se limitan al intestino delgado y la severidad de la infección varía entre distintas especies y depende de la edad del huésped. En varios modelos animales, la infección con rotavirus no está asociada a lesiones visibles, sin embargo, en algunos hay lesiones leves como pérdida de enterocitos y formación de vacuolas; o en ocasiones cambios mayores, como hiperplasia de las criptas. En los sujetos afectados por la infección, también se presenta un proceso inflamatorio, sin embargo la inflamación es moderada en comparación con la que se produce durante la infección con otros patógenos intestinales [revisado en Ramig, 2004].

La infección con rotavirus daña la función del epitelio intestinal. La diarrea que se produce durante la infección es un evento multifactorial producido por efectos de la replicación viral y por la respuesta del hospedero [revisado en Ramig, 2004]. La malabsorción, por ejemplo, resulta en el tránsito de disacáridos, carbohidratos, grasas y proteínas dentro del colon. Este bolo no digerido es

osmóticamente activo, impidiendo que el colon absorba agua suficiente, lo cual provoca una diarrea osmótica [Graham et al., 1988].

Durante la replicación viral, la proteína NSP4 induce un aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, hay un aumento en la secreción de Cl^- , esto entre otras causas, resulta en una diarrea aguda [revisado en Estes et al., 2007]. Asimismo, se ha encontrado que la proteína no estructural NSP4 o fragmentos de ésta, tienen actividad tipo enterotoxina e inducen diarrea cuando son inoculados en ratones [Ball et al. , 1996].

1.3 Ciclo replicativo

El ciclo replicativo de rotavirus (**Fig. 2**) comienza con la unión e internalización de las partículas virales a su célula hospedera. Estos procesos son mediados por las proteínas de capa externa VP4 y VP7, las cuales interaccionan con diversas moléculas en la superficie celular en un proceso finamente orquestado. Entre los receptores de unión se encuentra el ácido siálico presente en diversos gangliosidos y la integrina $\alpha 2\beta 1$. Mientras que las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$ y la chaperona hsc70 intervienen en procesos posteriores a la unión inicial [revisado en López & Arias, 2004]. La acción de proteasas sobre la proteína estructural VP4, da lugar a los polipéptidos VP8 y VP5, los cuales facilitan el proceso de entrada debido a la interacción de VP8 con ácidos siálicos y de VP5 con integrina $\alpha 2\beta 1$ [revisado en Arias et al., 2001; Estes, 2001; López & Arias, 2004].

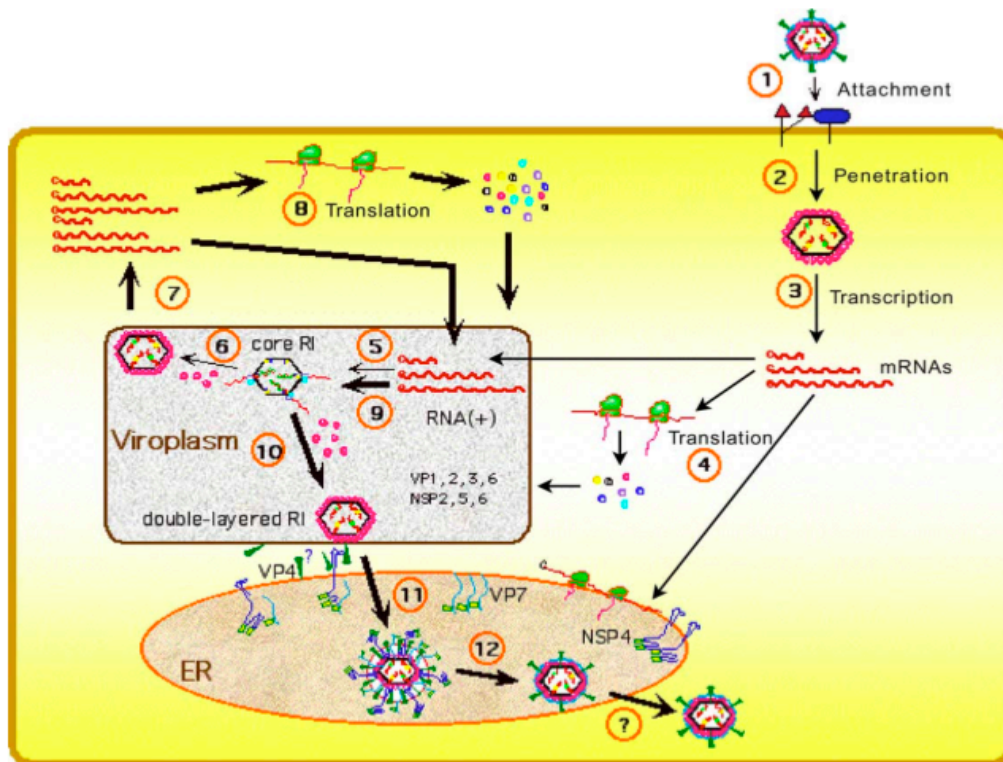


Figura 2. Ciclo replicativo de rotavirus. Los diferentes pasos en el ciclo de replicación viral se indican con números. 1: Unión del virión a la superficie celular; 2: Penetración y desnudamiento de la partícula viral para dar lugar a una partícula de doble capa (DLP); 3: Transcripción inicial del RNA genómico; 4: Síntesis de proteínas virales; 5: Ensamblaje de intermediarios de replicación de una capa y síntesis de RNA de polaridad negativa; 6: Ensamblaje de intermediarios de replicación de dos capas; 7: Transcripción tardía proveniente de los intermediarios de replicación de doble capa; 8: Segunda ronda de síntesis de proteínas virales; 9: Ensamblaje tardío de intermediarios de replicación de una capa y síntesis de RNA de polaridad negativa; 10: Ensamblaje tardío de intermediarios de replicación de doble capa; 11: Gemación de intermediarios de replicación de doble capa a través de la membrana del retículo endoplásmico y adquisición de una envoltura membranosa; 12: Pérdida de la envoltura membranosa y generación de viriones maduros de triple capa.

En el proceso de entrada, el virus pierde las proteínas de superficie VP4 y VP7, dando lugar a una partícula de doble capa que es transcripcionalmente activa (DLP, por sus siglas en inglés). La transcripción del genoma viral se lleva a cabo dentro de las DLPs para producir RNA de cadena sencilla de polaridad positiva. Parte de estos transcritos sirven como mensajeros para la síntesis de proteínas virales, las que posteriormente se agregan para formar los viroplasmos: estructuras electrodensas formadas principalmente por las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5. Otra parte de los transcritos se introduce en los viroplasmos, en donde se lleva a cabo la replicación del genoma, mediante intermediarios de replicación formados por las proteínas VP1, VP2 y VP3. Se ha propuesto que a medida que los mRNA virales se replican se van ensamblando

en la nucleocápside viral. Posteriormente se añade la proteína VP6 dando lugar a nuevas DLPs. La morfogénesis viral culmina en el retículo endoplásmico, donde se añade la tercera capa proteica formada por VP4 y VP7. Las partículas virales recién formadas salen de las células infectadas por lisis celular [revisado en Patton & Spencer, 2000].

Los transcritos virales dirigen la síntesis de seis proteínas estructurales (VP1 a VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1 a NSP6) [revisado en Estes et al., 2007]. En la [Tabla 1](#), se describen las principales características y funciones de las proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus.

Tabla 1. Principales funciones de las proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus.

Estructurales		No estructurales	
Proteína	Funciones	Proteína	Funciones
VP1	RNA polimerasa dependiente de RNA, se une al mRNA viral en 3'.	NSP1	Se une al mRNA viral en 5', envía a degradación a los factores de respuesta a interferón IRF-3, IRF-5 e IRF-7.
VP2	Cubre al genoma viral, interactúa con VP5 y se une a RNAs y RNAs de manera inespecífica.	NSP2	Tiene actividad de NTPasa, se une a RNAs de manera inespecífica, se une a NSP5 y VP1 y forma parte de los viroplasmos.
VP3	Guanilil-transferasa y metil-transferasa, se une a RNAs de manera inespecífica.	NSP3	Se une al mRNA viral en 3', inhibe síntesis de proteínas celulares.
VP4	Hemaglutinina, participa en unión y entrada a la célula.	NSP4	Enterotoxina que induce diarrea, moviliza calcio intracelular, funciona como receptor para DLPs en RE.
VP6	Antígeno específico de grupo.	NSP5	Forma parte de viroplasmos, se une a RNAs de manera inespecífica, interactúa con VP2, NSP2 y NSP6
VP7	Participa en unión y entrada a la célula, se une a calcio.	NSP6	Interactúa con NSP5.

Hasta el momento, se conocen algunos de los mecanismos mediante los cuales rotavirus usurpa la maquinaria de traducción de la célula y apaga la síntesis de proteínas. Rotavirus inhibe la síntesis de proteínas celulares por dos mecanismos diferentes: 1) Mediante la unión de la proteína viral no estructural NSP3 al factor de inicio de la traducción eIF4G1, lo cual desplaza a la proteína de unión a poli A (PABP), limitando así la traducción de RNAs mensajeros celulares [Piron et al., 1998] y 2) Por la fosforilación del factor eucariote de inicio de la traducción eIF2 α , lo que causa la inhibición de la traducción de la mayor parte de las proteínas celulares, mientras los RNAs mensajeros virales son traducidos de manera eficiente por un mecanismo aún desconocido [Montero et al., 2008].

1.4 Respuesta antiviral

1.4.1 Mecanismos celulares de reconocimiento viral.

Diversas moléculas celulares denominadas PRRs (*receptores de reconocimiento de patrones*, por sus siglas en inglés) reconocen componentes estructurales de patógenos denominados PAMPs (*patrones moleculares asociados a patógenos*, por sus siglas en inglés) [revisado en Gantier et al., 2007]. Estas interacciones desencadenan la producción de moléculas involucradas en la defensa ante una infección; en el caso de los virus, inicialmente se producen interferones (IFNs), los cuales inducen la expresión de cientos de moléculas antivirales [revisado en Gantier et al., 2007]. A continuación se describe de manera general estos sistemas, con un enfoque en el reconocimiento de partículas virales y la respuesta antiviral inducida a partir de estas interacciones moleculares tempranas.

Existen dos familias de PRRs responsables del reconocimiento de ácidos nucleicos:

- 1) Receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés) los cuales se localizan en endosomas y/o membrana plasmática como TLR-3, TLR-7, TLR-8 y TLR-9.
- 2) RLRs o receptores tipo RIG-I (del inglés, *retinoic acid inducible gene 1*), los cuales son receptores citoplásmicos y comprenden a RIG-I, MDA-5 (del inglés,

melanoma differentiation-associated gene 5) y LGP-2 (del inglés, laboratory of genetics and physiology 2) [revisado en Bowie et al., 2008].

Tanto RIG-I como MDA-5 señalizan a través de la proteína mitocondrial MAVS/IPS, lo cual induce la activación de diversos factores de transcripción como los factores reguladores de interferón 3 y 7 (IRF-3 e IRF-7, del inglés *Interferon Regulatory Transcription Factors*) y el factor nuclear κ B (NF- κ B). Posteriormente estos factores se traslocan al núcleo e inducen la expresión, entre otras moléculas, de interferones [revisado en Takeuchi et al., 2008] (**Fig 3**).

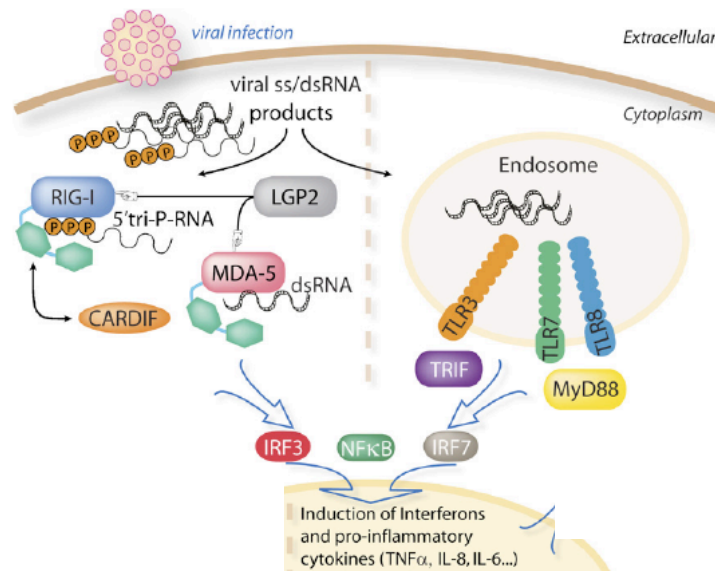


Figura 3. Sistemas antivirales de reconocimiento de RNA. En la izquierda del esquema, se representa el reconocimiento de productos virales de RNA de cadena sencilla por RIG-I (para RNAs con trifosfato en 5') o RNA de cadena doble por MDA-5. Este reconocimiento es regulado por LGP2 de manera negativa, mientras que CARDIF transduce la señal de RIG-I, lo cual resulta en la activación de diversos factores de transcripción. En la derecha del esquema, se muestra el reconocimiento de RNA de cadena sencilla o doble por receptores endosomales tipo Toll. Mediante la activación y el reclutamiento de moléculas adaptadoras como TRIF y MyD88, los TLRs 3, 7 y 8 activan factores de transcripción de respuesta a interferón (IRFs) y NF- κ B. Estos factores de transcripción inducen la expresión de interferones (IFNs) y citosinas pro-inflamatorias (Modificado de Gantier & Williams, 2007).

1.4.2 Estructura y función de los interferones.

Los IFNs se producen en respuesta a infecciones virales e inducen un estado antiviral en varios tipos celulares. Recientemente se ha evidenciado que además de promover la transcripción de genes que inhiben el ciclo replicativo de muchos tipos de virus, estas citosinas también orquestan la respuesta inmune adaptativa ante la infección viral [Bonjardim et al., 2009].

Existen tres tipos de interferones. Los IFNs tipo I comprenden la sub-familia más grande e incluyen a IFN- α (13 subtipos en humanos) e IFN- β . Todos estos IFNs comparten con los demás miembros de la misma subfamilia (ω , ϵ , κ , δ y τ) la habilidad de ejercer actividad antiviral y se encuentran agrupados en el brazo corto del cromosoma 9 en humanos, carecen de secuencias intrónicas y son similares genética y estructuralmente [Revisado en Pestka et al., 2004; Sadler & Williams, 2008]. Los IFNs tipo I transducen señales intracelulares a través de un receptor común denominado IFNAR1/2 [Novick et al., 1994].

Sólo existe un IFN tipo II denominado IFN- γ . Aunque también tiene actividad antiviral, el IFN- γ es una poderosa citosina inmuno-moduladora que modifica el ambiente intracelular por medio del reconocimiento de su receptor denominado IFNGR1/2 [Farrar & Schreiber, 1993]. Recientemente, se identificó una nueva familia de IFNs denominados IFNs tipo III, la cual consta de tres miembros: (IL)-29, IL-28A e IL-28B [Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003]. A diferencia de los IFNs tipo I, los IFNs tipo III si contienen secuencias intrónicas. Su receptor celular está compuesto por la cadena β del receptor de interleucina 10 y la cadena α del receptor de interleucina 28 [Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003].

1.4.3 Señalización inducida por interferones.

La interacción de los IFNs tipo I con su receptor heterodimérico formado por las subunidades IFNAR-1 e IFNAR-2, desencadena la activación de las cinasas TIK-2 y JAK-1, las cuales fosforilan a los transductores de señales y activadores de la transcripción STAT-1 y STAT-2, induciendo su dimerización y la asociación de este heterodímero al factor IRF9, formando un complejo conocido como ISGF3, el cual finalmente se trasloca al núcleo e induce la activación de una gran variedad

de genes estimulados por interferón (ISGs, por sus siglas en inglés) [revisado en Platánias, 2005; Takeuchi et al., 2008 & MacMicking, 2012] (**Fig 4**).

El IFN- γ se une a un receptor distinto en la superficie celular. Este receptor también está compuesto de dos subunidades: IFNGR1 e IFNGR2, los cuales se encuentran asociados con JAK1 y JAK2 respectivamente. La activación de las cinasas acopladas a los receptores de IFN- γ resulta en la fosforilación del transductor de señales y activador de la transcripción STAT1, induciendo la formación de homodímeros STAT1-STAT1 que se traslocan al núcleo y se unen a elementos GAS (sitio activado por IFN- γ) presentes en el promotor de ciertos ISGs [Revisado en Platánias, 2005; Takeuchi et al., 2008 & MacMicking, 2012] (**Fig 4**).

Los IFNs tipo III activan las mismas vías antivirales que los IFNs tipo I, sin embargo aunque los factores de transcripción activados por ambos tipos de interferones son idénticos (principalmente el factor ISGF3), comienzan a apreciarse algunas diferencias en la inducción y en la acción de estas dos familias de citosinas [revisado en Durbin et al., 2013].

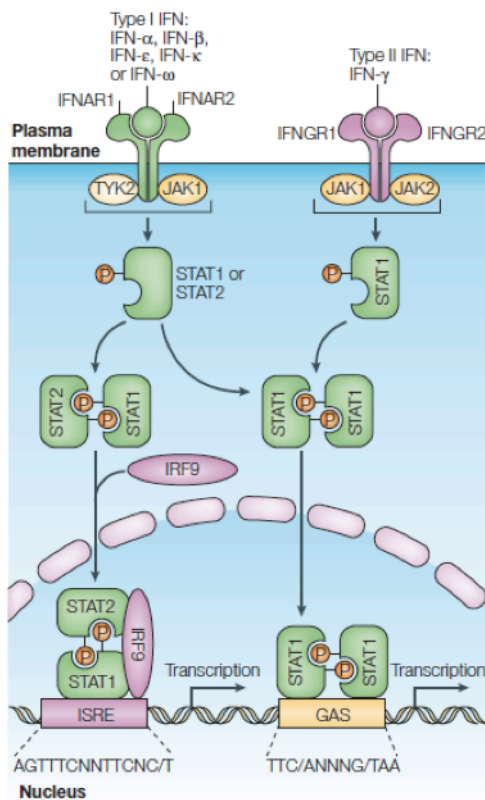


Figura 4. Activación de la vía clásica JAK-STAT por interferones (IFNs) tipo I y II. Todos los interferones tipo I se unen a un receptor común en la superficie celular. El receptor para IFN tipo I está compuesto por dos subunidades, IFNAR1 e IFNAR2, las cuales se encuentran asociadas con las cinasas JAK1 y TYK2 respectivamente. El único IFN tipo II, IFN- γ , se une a un receptor distinto en la superficie celular. Este receptor también está compuesto de dos subunidades: IFNGR1 e IFNGR2, los cuales se encuentran asociados con JAK1 y JAK2 respectivamente. La activación de las cinasas acopladas a los receptores de IFN resulta en la fosforilación de los transductores de señales y activadores de la transcripción STAT2 y STAT1, lo cual conlleva la formación del complejo STAT1-STAT2-IRF9 (Factor regulador de IFN 9), el cual se conoce como ISGF3. Este complejo se trasloca al núcleo y se une a elementos de respuesta a IFN (ISREs) en el DNA para iniciar la transcripción de genes estimulados por IFN (ISGs). Tanto el IFN tipo I como el tipo II inducen la formación de homodímeros de STAT1-STAT1 que se traslocan al núcleo y se unen a elementos GAS (sitio activado por IFN- γ) presentes en el promotor de ciertos ISGs (Tomado de Platánias, 2005).

1.4.4 Actividad antiviral de genes estimulados por interferón.

Algunos genes estimulados por interferón ampliamente caracterizados son: RIG-I, DAI (activador de IRFs dependiente de DNA), TRIM (proteínas de la familia con motivos tripartita), la proteína Mx de resistencia a mixovirus, ADAR (adenosina desaminasa de RNA), APOBEC3 (enzima reguladora del RNAm de la apolipoproteína B), PKR (proteína cinasa dependiente de RNAdc), así como el sistema 2',5'-oligoadenilato sintetasa (2'5'OAS)/RNasa L, entre muchos otros [revisado en Liu et al., 2009].

Estos receptores se activan en respuesta a distintos componentes virales, entre ellos el RNA de doble cadena (RNAdc). El RNAdc es uno de los PAMPs más importantes, ya que una vez que los receptores citoplásmicos detectan esta molécula se activa una cadena de eventos para inhibir la síntesis general de proteínas e inducir la producción de interferón y finalmente se induce la muerte celular de las células infectadas [revisado Gantier et al., 2007]. Recientemente, se describió que RIG-I y MDA-5, son necesarios para la inducción de la vía de IFN durante la infección con rotavirus [Broquet et al., 2011; Sen et al., 2011].

Cómo se mencionó anteriormente, hay distintas vías activadas en respuesta al RNAdc. En este trabajo sólo se describirá en detalle la activación de PKR y del complejo 2'-5'OAS/RNasa L, dos de los sistemas antivirales más importantes implicados en la inhibición de síntesis de proteínas, los cuales son objeto de evaluación en este proyecto.

La cinasa PKR se expresa en bajos niveles de manera constitutiva en el citoplasma, en estado no fosforilado y asociada a los ribosomas [Wang et al., 2004]. Cuando interacciona con el RNAdc mediante uno de sus dos dominios de unión a RNA, experimenta un cambio conformacional que induce su activación, su dimerización, y finalmente, ejerce su actividad de cinasa al fosforilar al factor eucarionte de inicio de la traducción eIF-2 α en la serina 51, lo cual resulta en la unión de este factor con eIF-2B, inhibiendo así la síntesis de proteínas [Samuel, 1993].

La 2'5' oligoadenilato sintetasa (2'5OAS) fue una de las primeras proteínas antivirales caracterizadas, sin embargo hasta el momento se desconoce su participación en diversas infecciones virales. En mamíferos, la familia de estas proteínas está compuesta por cuatro miembros: OAS1, OAS2, OAS3 y OASL [Rebouillat et al., 1999]. Al reconocer al RNAdc, esta proteína experimenta un cambio conformacional y se activa, dando lugar a la síntesis y posterior polimerización de los 2'5'-oligoadenilatos (2-5A). Estas moléculas, activan a la proteína RNasa L la cual se dimeriza y cataliza la degradación de RNAs celulares y virales [Hartmann et al., 2003].

1.5 Mecanismos de rotavirus para evadir la respuesta inmune innata.

Los virus utilizan múltiples estrategias para evadir los mecanismos de defensa de las células y rotavirus no es la excepción. Se han identificado dos estrategias mediante las cuales este virus inhibe la señalización para inducir la producción de IFN: a) Degradación vía proteasoma de los factores de transcripción reguladores de la respuesta a IFN (IRFs) 3, 5 y 7, por medio de la proteína viral no estructural NSP1 [Barro et al., 2007] y b) Degradación vía proteasoma de la proteína con repeticiones β -transducina (β -TrCP) mediante la proteína viral no estructural NSP1; β -TrCP está implicada en la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) [Graff et al., 2009]. Tanto los IRFs como NF- κ B, actúan como factores de transcripción de IFNs y otras citosinas pro-inflamatorias, por lo cual estos mecanismos son de suma importancia para la replicación y propagación de rotavirus. Además, rotavirus también posee la capacidad de inhibir la acumulación en el núcleo de los transductores de señales y activadores de la transcripción STAT1 y STAT2, lo cual resulta en la inhibición de la expresión de genes estimulados por interferón (ISGs)[Holloway et al., 2009]. El mecanismo de inhibición de la traslocación de estos factores aún no se ha identificado y este hallazgo sólo se ha demostrado en células infectadas que posteriormente fueron estimuladas por IFN y no en células estimuladas con IFN (en *estado antiviral*) posteriormente infectadas.

II. Justificación

Los interferones representan un componente crítico en la resolución de infecciones virales. Aunque algunas cepas de rotavirus poseen mecanismos para bloquear la producción de IFN, aún así, se produce una cantidad significativa de esta molécula antiviral durante la infección con distintas cepas de rotavirus en varios modelos animales y celulares.

El papel de las proteínas de rotavirus en el bloqueo de la señalización inducida por interferón o en el antagonismo de genes estimulados por interferón, es un campo poco explorado. En el presente trabajo se evaluó el ciclo infeccioso de rotavirus en células estimuladas con IFN tipo I, que representa un modelo de células en “estado antiviral”, con lo cual se puede determinar si distintas cepas son afectadas de manera diferencial por los efectos de diversos genes estimulados por IFN.

La importancia de estos estudios se basa en: a) Generación de conocimiento acerca de la biología molecular de virus de RNA de doble cadena y los mecanismos que estos emplean para llevar a cabo una infección productiva y b) Identificación de moléculas inducidas por interferón con actividad antiviral específica contra rotavirus y/o proteínas virales esenciales para la replicación que puedan ser empleadas como blancos terapéuticos.

Bajo este mismo contexto, en este trabajo se evaluó la actividad de dos sistemas antivirales: PKR y RNasa L/2'5'-OAS. De la amplia gamma de moléculas antivirales, se seleccionaron estos dos sistemas debido a que en nuestro laboratorio recientemente se identificó que la cinasa PKR es responsable de la fosforilación de eIF2 α durante la infección con rotavirus, mientras que el sistema 2'5'-OAS/RNasa L se inhibe durante la infección. Tanto la activación de PKR, como la inhibición de la RNasa L, se caracterizaron en células MA104, cuya característica principal es una alta permisividad a la infección por rotavirus. En este trabajo se evaluó la actividad de estas moléculas antivirales en una línea celular con permisividad diferencial en fases posteriores a la entrada.

Estos estudios permitirán ampliar el conocimiento acerca de los mecanismos celulares antivirales que participan en la restricción del ciclo replicativo viral. A pesar de las vacunas presentes en el mercado, la infección con rotavirus causa la muerte de aproximadamente 500,000 infantes y neonatos por año a nivel mundial, lo cual indica la urgencia de tratamientos efectivos para esta enfermedad.

III. Hipótesis

La estimulación de células en cultivo con IFN tipo I puede restringir el ciclo infeccioso de rotavirus de manera cepa dependiente y la distinta permisividad a la infección de diferentes líneas celulares puede ser debido a variaciones en la actividad de algunos sistemas antivirales celulares.

IV. Objetivos

Objetivo general

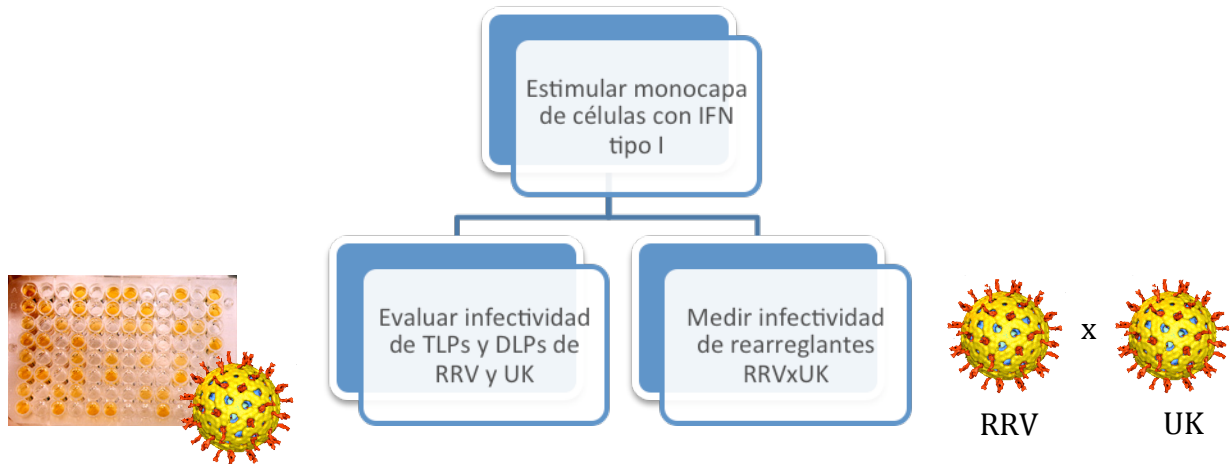
Caracterizar la infección de rotavirus en células MA104 estimuladas con IFN tipo I y evaluar la permisividad de distintas líneas celulares a la infección.

Objetivos particulares

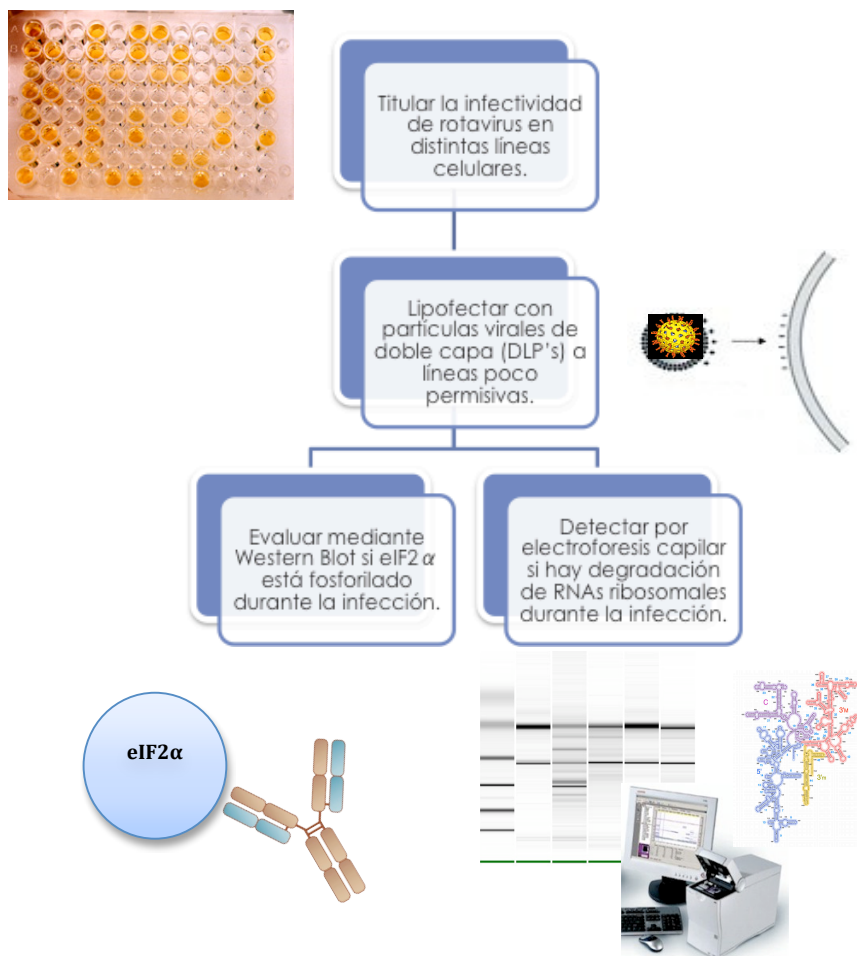
- a) Evaluar la infectividad de partículas virales de triple capa (TLPs) y partículas virales de doble capa (DLPs) de las cepas UK y RRV en células MA104 estimuladas con IFN tipo I.
- b) Determinar la contribución de proteínas virales específicas en la resistencia a IFN tipo I mediante la infección con rearreglantes de las cepas UK y RRV.
- c) Estudiar el papel de VP4 en la resistencia a IFN tipo I mediante la evaluación de la infectividad de variantes de RRV que poseen mutaciones en esta proteína.
- d) Determinar la infectividad de TLPs y DLPs en distintas líneas celulares para identificar una línea celular con permisividad diferencial en pasos posteriores a la entrada.
- e) Evaluar la síntesis de proteínas durante la infección en la línea celular con permisividad diferencial, mediante marcaje metabólico con ³⁵S.
- f) Determinar la actividad de PKR durante la infección en la línea celular con distinta permisividad, por medio de la detección de eIF2 α fosforilado.
- g) Evaluar la actividad del complejo 2',5'-OAS/RNasa L en la línea celular con permisividad diferencial, mediante la detección de la degradación de los RNAs ribosomales durante la infección.

V. Esquema metodológico

Caracterización del ciclo infeccioso de rotavirus en células MA104 estimuladas con IFN tipo I



Evaluación de la permisividad de distintas líneas celulares a la infección



VI. Materiales y Métodos

6.1 Líneas celulares, anticuerpos y reactivos.

Las líneas celulares se crecieron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 5% de suero en el caso de MA104 (riñón de mono verde) y 10% de suero más alta glucosa para HUH 7.5.1 (hepatocarcinoma humano), Caco-2 (epitelio de adenocarcinoma colorrectal humano) y L929 (fibroblastos embrionarios de ratón). Se utilizaron anticuerpos de conejo anti-fosfo-eIF2 α y anti-eIF2 α de Cell Signaling (Boston, MA). Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-conejo acoplado a peroxidasa A (Pekin Elmer, MA). El Interferón recombinante IFN- α A/D Sigma-Aldrich (MO, USA), se diluyó de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se empleó en el medio de cultivo correspondiente a cada línea celular. La neuraminidasa de *Arthrobacter ureafaciens* de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO) se empleó a una concentración de 80mU/ml como se describió previamente [Mendez et al., 1993]. Para el control de eficiencia de transfección se empleó el plásmido pcDNA3.1-GFP de expresión en células de mamífero (Invitrogen, CA).

6.2 Cepas virales.

La cepa RRV de simio empleada en este estudio se obtuvo del laboratorio del Dr. H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA), la cepa bovina UK fue donada por el Dr. D. R. Snodgrass (Moredun Research Institute, Edinburgh, United Kingdom) y la cepa porcina YM fue aislada en nuestro laboratorio (Ruíz et al., 1988). Todas las cepas se propagaron en células MA104 de la siguiente manera: se activó el virus con una concentración final de tripsina de 10 μ g/ml (Gibco, BRL) por 30 minutos a 37°C. Se infectaron células a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 y se cosecharon a las 16 horas mediante lisis por congelación. Por último se determinó el título del lisado viral obtenido como se indica en el siguiente apartado. Las partículas virales de doble capa (DLPs) de las cepas UK y RRV, se purificaron por gradientes de densidad en CsCl, como se reportó previamente [Espejo et al., 1981]. Las rearreglantes RRVxUK empleadas en este trabajo se describieron previamente [Feng et al., 2009], mientras que las rearreglantes RRVxYM se obtuvieron en nuestro laboratorio mediante coinfecciones con virus de ambas cepas en células MA104. Los lisados virales

obtenidos fueron sometidos a ensayos en placa para aislar clonas específicas como se describe en Hoshino et al., 2002.

6.3 Determinación del título viral.

Se emplearon monocapas de células MA104, HUH 7.5.1, Caco-2 y L-929, las cuales se infectaron con diluciones seriadas de virus de las cepas RRV y UK. A las 14 horas post-infección (hpi) se fijaron con acetona al 80% por 30 minutos a temperatura ambiente (TA), se lavaron con PBS, se incubaron con el suero policlonal anti-TLPs diluido 1:2000 en PBS por una hora a 37°C, se realizó un lavado con PBS y se añadió el anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa A 1:3000 en PBS por una hora a 37°C y se realizó un último lavado antes de proceder al revelado, en el que se añadió a la monocapa celular una solución de 3-amino-9-etil-carbazole (Sigma), el cual funciona como sustrato para la peroxidasa y produce una coloración café en las células infectadas.

El conteo de células infectadas se llevó a cabo en el microscopio óptico, se determinó el título viral utilizando la siguiente fórmula: [Número de focos contados] \times [dilución de lisado viral] \times [9.5 (Área total del pozo)] \times [20 (referencia a 1ml de lisado viral)], el resultado se expresó como unidades formadoras de foco por mililitro (UFF/ml).

En los experimentos en los cuales se determinó el porcentaje (%) de infectividad, se llevaron a cabo ensayos de infectividad empleando multiplicidades de infección bajas (0.02) con la finalidad de contar aproximadamente 200 focos infecciosos. Para evidenciar los focos infecciosos se llevaron a cabo ensayos de inmunoperoxidasa como se indicó previamente.

6.4 Purificación de partículas de doble capa (DLPs) y RNAdc.

Los lisados virales producidos como se indicó previamente, se centrifugaron a 30,000 rpm por 1 h a 4°C empleando un rotor SW40 (Beckman, Fullerton, CA). El pellet obtenido se resuspendió en TN (10mM Tris-HCl pH 7.5, 140mM NaCl) toda la noche (ON). Se realizaron 3 extracciones con freón, añadiendo un volumen igual de este solvente y de TN. Al final se recolectaron las fases acuosas, las cuales se centrifugaron sobre un colchón de sacarosa al 45% durante 1 hora a

30,000rpm. Las partículas virales se recuperaron en el pellet de esta centrifugación

Para obtener RNA de doble cadena (RNAdc), se realizaron dos extracciones con fenol/cloroformo del pellet obtenido del colchón de sacarosa. Para obtener DLPs, la muestra se trató con EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid) y se calentó a 50°C durante 15 minutos antes de pasarla por el colchón de sacarosa, el pellet obtenido se resuspendió en TN. Este tratamiento desprende la capa externa de las partículas virales.

6.5 Lipofección de DLPs, transfección de plásmidos y RNAdc.

La metodología de lipofección de DLPs, transfección de plásmidos y RNAdc sólo varía en la concentración de las moléculas que se desean lipofectar. En el caso de DLPs, se diluyeron en MEM libre de suero (s/s) a una concentración de 10µg/ml; para el plásmido la concentración usada fue de 100µg/ml; y en el caso de RNAdc de 10 µ g/ml. La concentración de lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) que se empleó fue de 20µl/ml en todos los casos. La mezcla lipofectante se añadió a una monocapa confluyente de células, se incubó a 37°C por 1h, la monocapa se lavó con MEM s/s y se añadió el mismo volumen de medio empleado para el crecimiento de las células. En el caso de la lipofección con DLPs, después de la transfección, se incubaron las células 14h a 37°C y posteriormente se fijaron y tiñeron por inmunoperoxidasa como se indicó previamente. Las células transfectadas con RNAdc se cosecharon a las 12 horas para evaluar la integridad de los RNAs ribosomales y las células transfectadas con el plásmido de GFP se incubaron por 18h y se contó el número de células que expresan GFP en un microscopio de fluorescencia Apotome.

6.6 Marcaje radiactivo de proteínas.

Se infectaron monocapas de células HUH 7.5.1 y MA104 con virus de las cepas RRV y UK a una MOI de 5, como se indicó en el apartado “cepas virales”. A las 6 horas post-infección se incubaron las células con MEM sin metionina (MEM^{-Met}) suplementado con 25µCi/ml de Easy Tag Express-[35S] labeling mix (Dupont NEN), las células se incubaron con este medio durante 30 minutos y

posteriormente se lisaron con RIPA, solución que contiene: 25mM NaF, 1mM NaOV, 50nM Tris pH 7.4, 100mM KCL, 1mM EGTA, 1mM DTT, 10% glicerol y 1% Tritón X-100, suplementada con un coctel de inhibidores de proteasas (Compleat EDTA-free, Roche Indianápolis, IN) por 15 minutos a 4°C. Estos lisados se centrifugaron por 5 minutos a 13,000 rpm y posteriormente se colectaron los sobrenadantes, las proteínas se separaron por SDS-PAGE, se secó el gel en un secador con vacío, y se expuso por autoradiografía durante 4 días a 4°C en una cámara de exposición a 70°C, para detectar la señal de la marca radiactiva.

6.7 Western blot

A los lisados celulares obtenidos como se refiere en el párrafo anterior, se les adicionó buffer de carga (50mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol y 1% de β -mercaptoetanol), posteriormente se hirvieron por 5 minutos y se separaron por SDS-PAGE. Se realizó la transferencia a una membrana inmobilon-NC (Millipore), durante 1h a 130mA utilizando buffer de transferencia CAPS 10mM pH 11, 10% de metanol.

Una vez realizada la transferencia, la membrana se trató con solución de bloqueo (5% leche baja en grasa, 0.1% Tween 20, en PBS) por 12hrs a 4°C, posteriormente se incubó con el anticuerpo primario diluido 1:1000 en PBS, 5% BSA, 0.1% Tween 20 por 24 horas, se realizaron 3 lavados con PBS, 0.1% Tween 20 y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa 1:5000 en PBS, 2% leche, 0.1% Tween 20, por 1h a TA. Por último se lavó la membrana 3 veces con PBS, 0.1% Tween 20 y se llevó a cabo el revelado con sustrato para peroxidasa Western Lightning-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate (Perkin-Elmer, Massachusetts) empleando una película hipersensible Kodak® X-Omat.

VII. Resultados

Caracterización del ciclo infeccioso de rotavirus en células MA104 estimuladas con IFN tipo I

7.1 Efecto de interferón tipo I en la infectividad de rotavirus de la cepas RRV y UK en células MA104 y HUH 7.5.1.

En estudios previos se ha reportado que los interferones restringen la replicación de rotavirus y disminuyen el rendimiento viral en heces de ratones [Broquet et al., 2011; Frias et al., 2011; Pott et al., 2011; Sen et al., 2011; Sen et al., 2012]. En el presente trabajo se evaluó la restricción del IFN sobre el ciclo infeccioso, empleando un interferón recombinante denominado IFN- α A/D, el cual estimula receptores de IFN tipo I y es activo en distintas células de mamífero. Se estimularon células MA104 con diferentes concentraciones de IFN- α A/D para determinar la concentración y el tiempo de estimulación óptimos para obtener una máxima inhibición de la infectividad de las cepas RRV y UK, la cual se evaluó mediante ensayos de inmunoperoxidasa (**fig. 1**). Se determinó que rotavirus de la cepa bovina UK presenta una sensibilidad mayor a IFN que rotavirus de la cepa RRV, el cual fue escasamente afectado por el tratamiento. La sensibilidad de rotavirus de ambas cepas aumenta de manera dependiente de la concentración de IFN, mientras que el tiempo de estimulación no induce variaciones en la sensibilidad observada, por lo cual en futuros ensayos se decidió emplear un tiempo de estimulación de 16 horas.

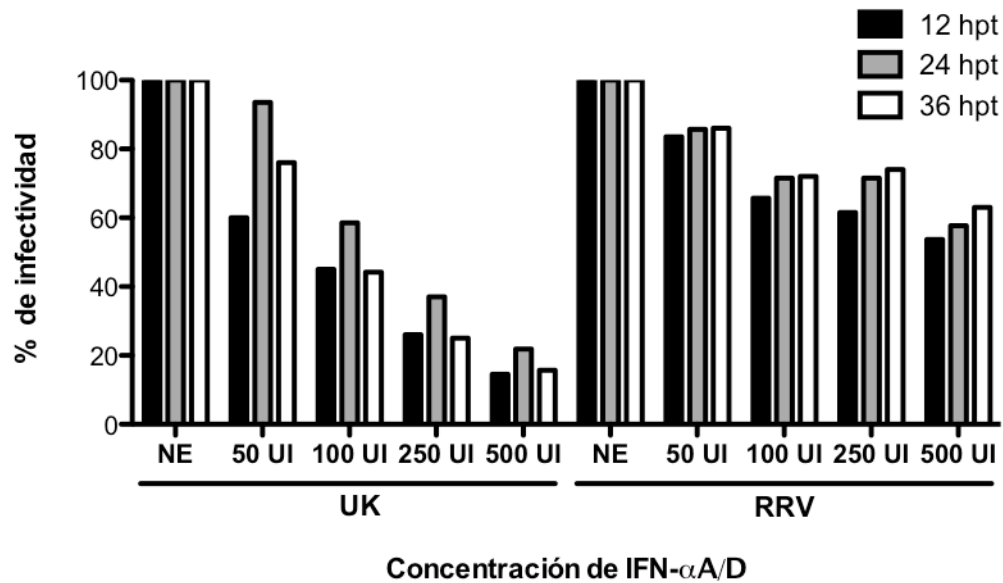


Figura 1. Rotavirus de la cepa bovina UK presenta una mayor sensibilidad al efecto de IFN- α /D que rotavirus de la cepa de simio RRV. Se muestra el porcentaje de infectividad de rotavirus de la cepas UK (izquierda) y RRV (derecha) obtenido en células MA104 a 12, 24 y 36 horas post-tratamiento (hpt) con IFN- α /D a concentraciones de 50U, 100U, 250U y 500U respectivamente. Los datos se normalizaron a 100% con respecto a células no estimuladas con IFN, indicado como NE. Este experimento se realizó una vez (n=1) por triplicado.

Con la finalidad de evaluar si concentraciones más altas de IFN- α /D restringen en mayor medida la infectividad de rotavirus de las cepas RRV y UK, se realizaron ensayos empleando concentraciones de 500, 1000, 2500 y 5000 UI. En estos ensayos solamente se empleó un tiempo de estimulación de 16 horas. Con todas las concentraciones de IFN- α /D empleadas, la infectividad de UK fue significativamente menor (**P \leq 0.01) que la infectividad de RRV en cada caso (**fig. 2**), sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la inhibición de la infectividad de UK con las distintas concentraciones de IFN tipo I empleadas, por lo cual las condiciones que se establecieron para posteriores ensayos fueron: 16 horas de estimulación con 500 UI/ml de IFN- α /D.

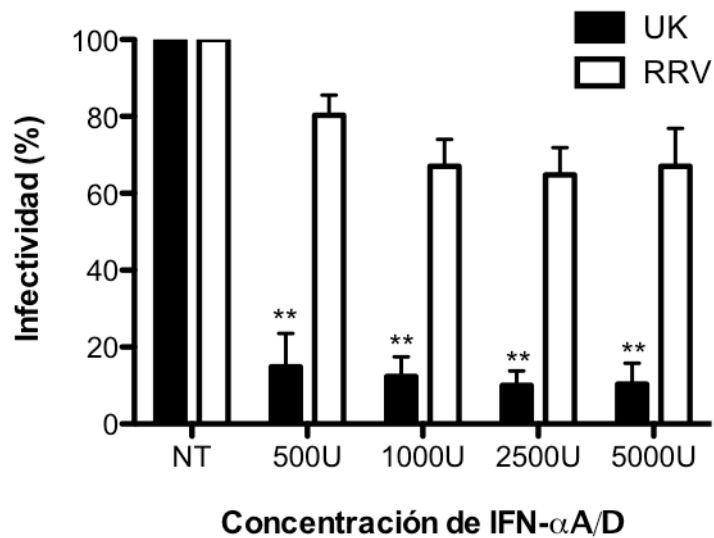


Figura 2. Concentraciones entre 500U y 5000U de IFN-αA/D tienen un efecto similar en la inhibición de la infectividad de rotavirus. Se muestra el porcentaje de infectividad de las cepas UK y RRV obtenido en células MA104 a 16 horas post-tratamiento con IFN-αA/D a concentraciones de 500U, 1000U, 2500U y 5000U respectivamente. Los datos se normalizaron a 100% con respecto a células no tratadas con IFN, indicado como NT. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de dos experimentos independientes (n=2) por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la infectividad de UK y RRV en células tratadas con diferentes concentraciones de IFN (**P≤0.01).

Para determinar si el efecto de la estimulación con interferón se conserva durante todo el ciclo replicativo o se requiere de una estimulación posterior a la infección para una mayor inhibición de la infectividad, se estimularon células MA104 con IFN-αA/D por 16 horas, posteriormente se infectaron con rotavirus de las cepas RRV y UK durante 1h, se retiró el inóculo viral y se estimularon de nuevo con IFN-αA/D por 14 horas. Este ensayo sólo se realizó una vez ya que no se observó diferencia entre las células a las que sólo se les dio el estímulo antes de la infección y aquellas que también fueron estimuladas después de la infección (**fig. 3**), lo cual indica que la estimulación con IFN antes de la infección es suficiente para estudiar el efecto de la inhibición de la infectividad de rotavirus mediada por esta molécula antiviral.

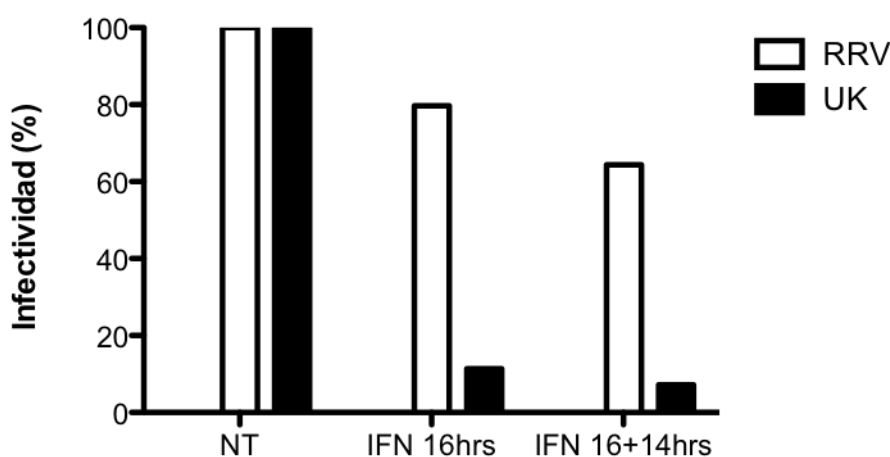


Figura 3. El tratamiento con IFN- α A/D antes de la infección es suficiente para reducir la infectividad de rotavirus. Se muestra el porcentaje de infectividad de las cepas RRV y UK obtenido en células MA104 a 16 horas post-tratamiento con IFN- α A/D (“IFN 16hrs”) y a 16 horas post-tratamiento más 14 horas de estimulación durante la infección (“IFN 16+14hrs”), empleando una concentración de IFN- α A/D de 500U. Los datos se normalizaron a 100% con respecto a células no tratadas con IFN, indicado como NT. Este experimento se realizó una vez (n=1) por triplicado.

Para continuar con el estudio de la restricción del ciclo replicativo por IFN tipo I, se evaluó la infectividad de partículas virales de doble capa (DLPs) en células tratadas con IFN- α A/D. Las DLPs carecen de las proteínas de la capa externa VP4 y VP7, por lo tanto no son naturalmente infecciosas; sin embargo al introducirlas a la célula mediante ensayos de transfección son transcripcionalmente activas y son capaces de iniciar el ciclo replicativo viral. Mediante estos ensayos, se determinó que, a diferencia de los ensayos con partículas virales completas, al transfectar DLPs de rotavirus de la cepa RRV, este virus resultó ser sensible a IFN tipo I, disminuyendo su infectividad de manera significativa (** $P \leq 0.001$) en alrededor de 90% (**fig. 4**), lo cual sugiere que alguna de las proteínas de capa externa de esta cepa (VP4 y/o VP7) podría estar implicada en la resistencia a IFN tipo I.

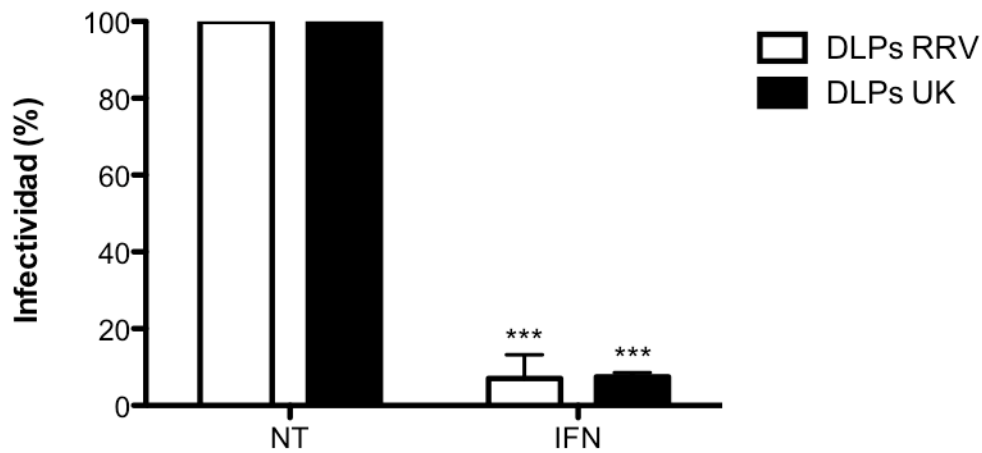


Figura 4. Las proteínas de capa externa de rotavirus de la cepa RRV están implicadas en la resistencia a IFN tipo I. Porcentaje de infectividad obtenido al transfectar partículas virales de doble capa (DLPs) de las cepas RRV y UK en células MA104 a 16 horas post-tratamiento con IFN- α /D a una concentración de 500U. Los datos se normalizaron a 100% con respecto a células no tratadas con IFN, indicado como NT. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3) por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la infectividad de cada cepa en células tratadas con interferón y en células no tratadas (***) $P \leq 0.001$).

En otros ensayos, encontramos que rotavirus se replica de manera muy eficiente en etapas posteriores a la entrada en la línea celular HUH 7.5.1 (Ver apartado siguiente “Evaluación de la permisividad de distintas líneas celulares a la infección”). Para determinar si alguno de los factores implicados en la alta permisividad de esta línea celular pudiera ser la ausencia expresión de un gen que se sobre-expresa en presencia de IFN tipo I, se estimularon células HUH 7.5.1 con diferentes concentraciones de IFN- α A/D. En esta línea celular se determinó que: a) El efecto en la inhibición de la infectividad es cepa dependiente al igual que en la línea celular MA104 y b) Contrario a lo esperado, la inhibición de la infectividad es mayor que en MA104, tanto para la cepa UK como para RRV y aumenta de manera concentración dependiente de IFN (**fig. 5**).

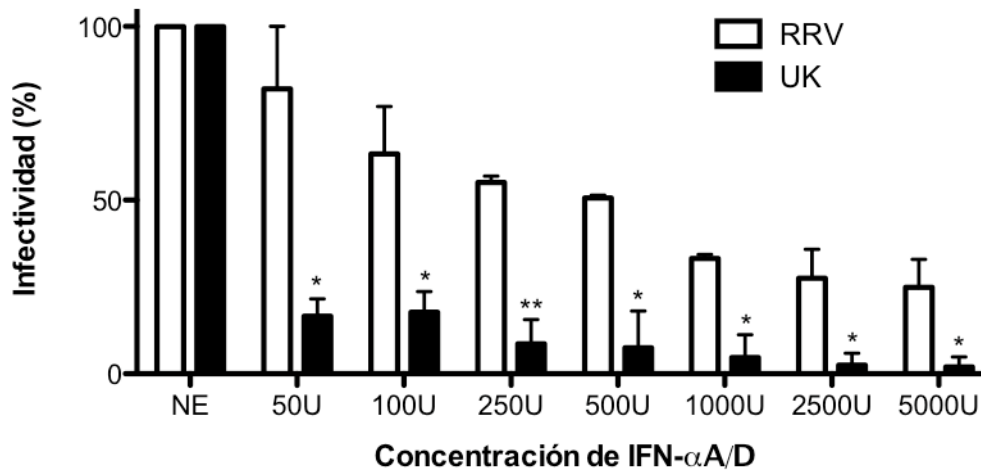


Figura 5. La inhibición de la infectividad de rotavirus por IFN- α A/D es mayor en la línea celular HUH 7.5.1. Porcentaje de infectividad de las cepas UK y RRV obtenido en células HUH 7.5.1 a 16 horas post-tratamiento con IFN- α A/D a concentraciones de 50U, 100U, 250U, 500U, 1000U, 2500U y 5000U respectivamente. Los datos se normalizaron a 100% con respecto a células no estimuladas con IFN, indicado como NE. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de dos experimentos independientes (n=2) por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la infectividad de RRV y UK en células tratadas con diferentes concentraciones de interferón (*P \leq 0.05, **P \leq 0.01).

Para probar si el efecto observado mediante la transfección de DLPs en la línea celular MA104 se conserva en la línea celular HUH 7.5.1, se realizaron los mismos ensayos en esta línea celular. Efectivamente, se corroboró que también en la línea celular HUH 7.5.1, rotavirus de la cepa RRV se vuelve sensible a los efectos de IFN cuando DLPs son lipofectadas directamente al interior de las células (**fig. 6**), lo cual indica que las proteínas de capa externa también están implicadas en la resistencia a IFN tipo I en esta línea celular y que los ISGs que afectan la replicación de las DLPs, también se encuentran presentes en esta línea celular.

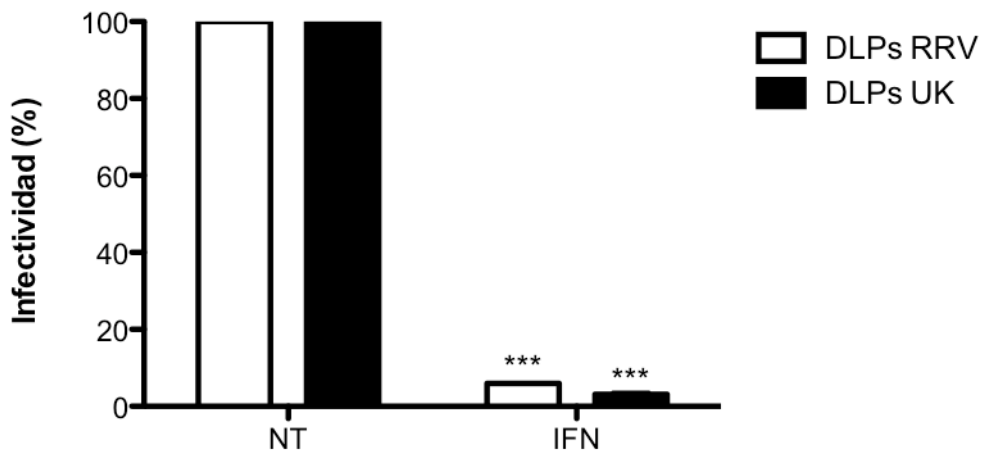


Figura 6. La inhibición de la infectividad de DLPs de rotavirus por IFN- α /D es análoga en la línea celular HUH 7.5.1. Porcentaje de infectividad obtenido al transfectar partículas virales de doble capa (DLPs) de las cepas RRV y UK en células HUH 7.5.1 a 16 horas post-tratamiento con IFN- α /D a una concentración de 500U. Los datos se normalizaron a 100% con respecto a células no tratadas con IFN, indicado como NT. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de dos experimentos independientes (n=2) por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la infectividad de cada cepa en células tratadas con interferón y en células no tratadas (***) $P \leq 0.001$.

En resumen, se determinó que existe una restricción de la infectividad de rotavirus por IFN tipo I. Se encontró que en la línea celular MA104, la cepa UK es sensible a los efectos de esta molécula antiviral, mientras que la cepa RRV es escasamente afectada por el tratamiento. Sin embargo RRV se vuelve sensible a los efectos de IFN una vez que ha perdido las proteínas de capa externa VP4 y VP7, lo cual sugiere que alguna de estas proteínas está implicada en la resistencia/sensibilidad a IFN tipo I, ya sea interactuando directamente con alguna proteína antiviral o induciendo algún evento de señalización para inhibir la respuesta antiviral celular; o bien, que la sensibilidad a IFN depende de la vía endocítica empleada por cada una de estas cepas de rotavirus durante el proceso de entrada [Díaz-Salinas et al., 2013].

La infectividad de TLPs y DLPs de las cepas UK y RRV también se evaluó en la línea celular HUH 7.5.1, en la cual el comportamiento de DLPs de ambas cepas es similar, sin embargo la inhibición de la infectividad de TLPs es mayor en esta línea celular (**fig. 7**). Con estos estudios, se estableció que MA104 es un buen modelo para el estudio del efecto de la sensibilidad a interferón de las cepas de rotavirus UK y RRV, ya que el fenotipo de sensibilidad de UK y resistencia de RRV es más contrastante en esta línea celular.

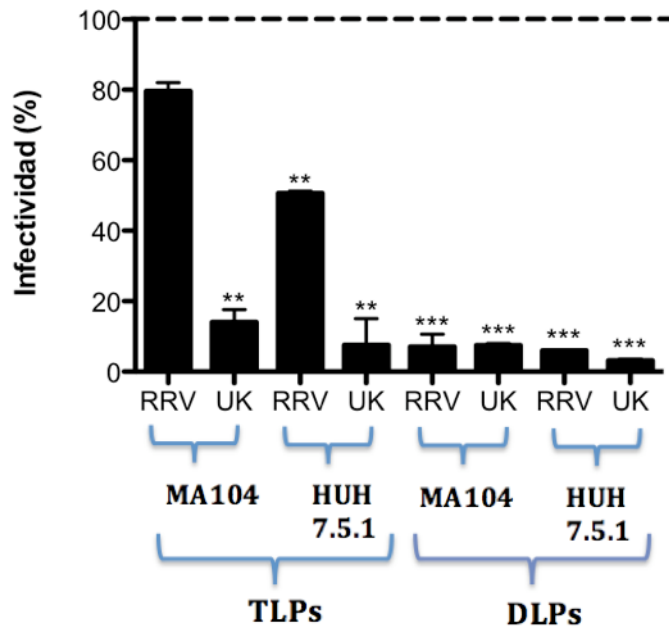


Figura 7. La sensibilidad a IFN de rotavirus depende de la cepa viral empleada y este efecto es independiente de la línea celular utilizada. Porcentaje de infectividad de partículas virales de triple capa (TLPs) o doble capa (DLPs) de las cepas de rotavirus RRV y UK en células MA104 y HUH 7.5.1 a 16 horas post-tratamiento con IFN- α A/D empleando una concentración de 500U. Los datos se normalizaron a 100% con respecto a células no tratadas con IFN, indicado por la línea punteada. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3) por triplicado para la línea celular MA104 y dos experimentos independientes (n=2) por triplicado para la línea celular HUH 7.5.1. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la infectividad de cada cepa en células tratadas con interferón y en células no tratadas (**P \leq 0.01, ***P \leq 0.001).

7.2 Infectividad de rearreglantes y variantes de rotavirus en células estimuladas con IFN tipo I.

Una estrategia para identificar el gen o genes virales responsable(s) de algún fenotipo determinado de rotavirus es el uso de rearreglantes entre cepas que presentan características diferentes. En el presente trabajo, para encontrar una correlación entre la resistencia a IFN de algunas cepas de rotavirus y alguna proteína viral, se evaluó la infectividad de rearreglantes entre las cepas RRV y UK en células MA104 estimuladas con IFN tipo I, la **tabla 2** muestra el genotipo de estas rearreglantes.

Tabla 2. Genotipo de rearreglantes entre las cepas de rotavirus RRV (simio) y UK (bovino) empleadas en este estudio.

	Gene 1	Gene 2	Gene 3	Gene 4	Gene 5	Gene 6	Gene 7	Gene 8	Gene 9	Gene 10	Gene 11
RRV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
UK	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
1	R	R	R	R	U	U	R	R	R	R	R
2	R	R	R	R	R	U	R	R	R	U	R
3	R	R	R	R	R	U	R	R	R	R	R
4	U	R	R	R	U	R	U	R	U	R	R
5	U	U	U	U	U	U	R	U	U	U	U
6	U	U	U	U	U	R	R	U	R	R	R
7	U	R	U	U	U	R	U	U	U	R	R

Al probar la infectividad de las rearreglantes en células MA104 tratadas con IFN tipo I, se encontró que hay una correlación entre la sensibilidad a IFN de las rearreglantes 5, 6 y 7, las cuales tienen los segmentos 3, 4 y 8 de la cepa UK y la resistencia de las rearreglantes 1, 2, 3 y 4, que tienen segmentos equivalentes de la cepa RRV (**fig. 8**). Los ensayos de transfección de DLPs realizados previamente, sugerían que una de las proteínas de capa externa es la responsable de determinar la sensibilidad/resistencia a IFN tipo I. Los resultados obtenidos con las rearreglantes sugieren que la proteína VP4 de la cepa RRV probablemente es la responsable del fenotipo de resistencia para sobrepasar el “estado antiviral” de las células estimuladas con IFN tipo I; ya que se encontró una correlación directa entre el fenotipo de resistencia observado y el gen 4 de RRV, el cual codifica la proteína VP4.

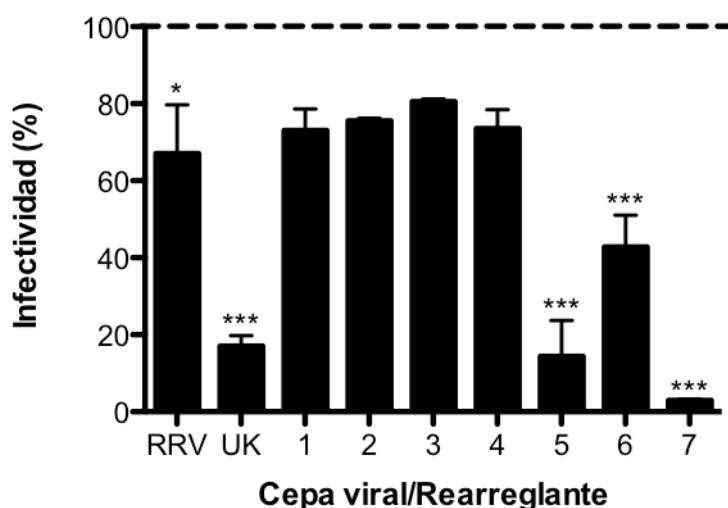


Figura 8. La proteína VP4 de la cepa RRV confiere resistencia a los efectos de IFN tipo I. Porcentaje de infectividad de las cepas UK, RRV y de rearreglantes de estas cepas (presentadas en orden numérico; ver genotipo correspondiente en Tabla 1) obtenido en células MA104 a 16 horas post-tratamiento con IFN- α A/D empleando una concentración de 500U. Los datos se normalizaron a 100% con respecto a células no tratadas con IFN, indicado por la línea punteada. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3) por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la infectividad de cada virus en células tratadas con interferón y no tratadas (*P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001).

Para probar si el fenotipo de resistencia/sensibilidad a IFN de las rearreglantes se conservaba en la línea celular HUH 7.5.1., se realizaron los mismos ensayos en esta línea celular. Se observó el mismo fenotipo en la línea celular HUH 7.5.1, lo cual indica que el mecanismo de inhibición de la infectividad por IFN tipo I es similar en ambas líneas celulares (**fig. 9**).

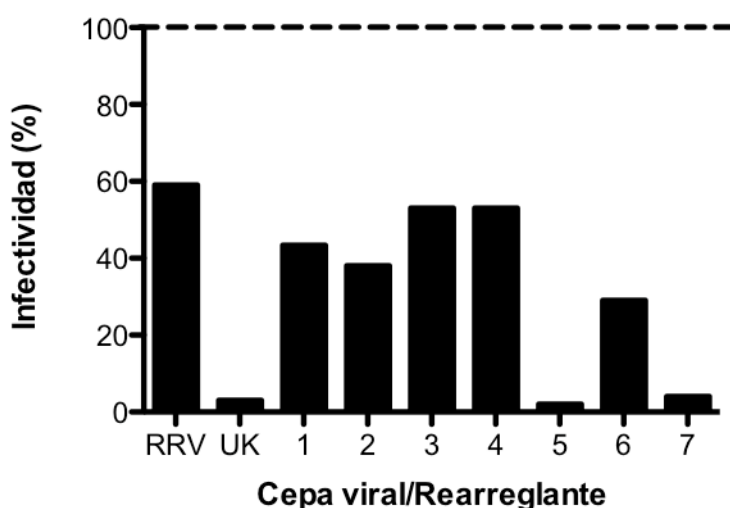


Figura 9. La inhibición de la infectividad de rearreglantes RRVxUK por IFN- α A/D es análoga en la línea celular HUH 7.5.1. Porcentaje de infectividad de las cepas UK, RRV y de rearreglantes de estas cepas (presentadas en orden numérico; ver genotipo correspondiente en *Tabla 2*) obtenido en células HUH 7.5.1 a 16 horas post-tratamiento con IFN- α A/D empleando una concentración de 500U. Los datos se normalizaron a 100% con respecto a células no tratadas con IFN, indicado por la línea punteada. Este experimento se realizó una vez (n=1) por triplicado.

Se verificó la identidad de las rearreglantes RRVxUK, para cerciorarnos de que los resultados de resistencia a IFN tipo I obtenidos corresponden con el genotipo descrito. Para esto se extrajo el RNA genómico de las partículas virales de cada rearreglante, se corrió en un gel de poliacrilamida, y se evidenciaron las bandas correspondientes a los distintos segmentos del genoma de rotavirus mediante tinción con plata. Se corroboró que todas las rearreglantes poseen los segmentos indicados en la *tabla 2* (**fig. 10**).

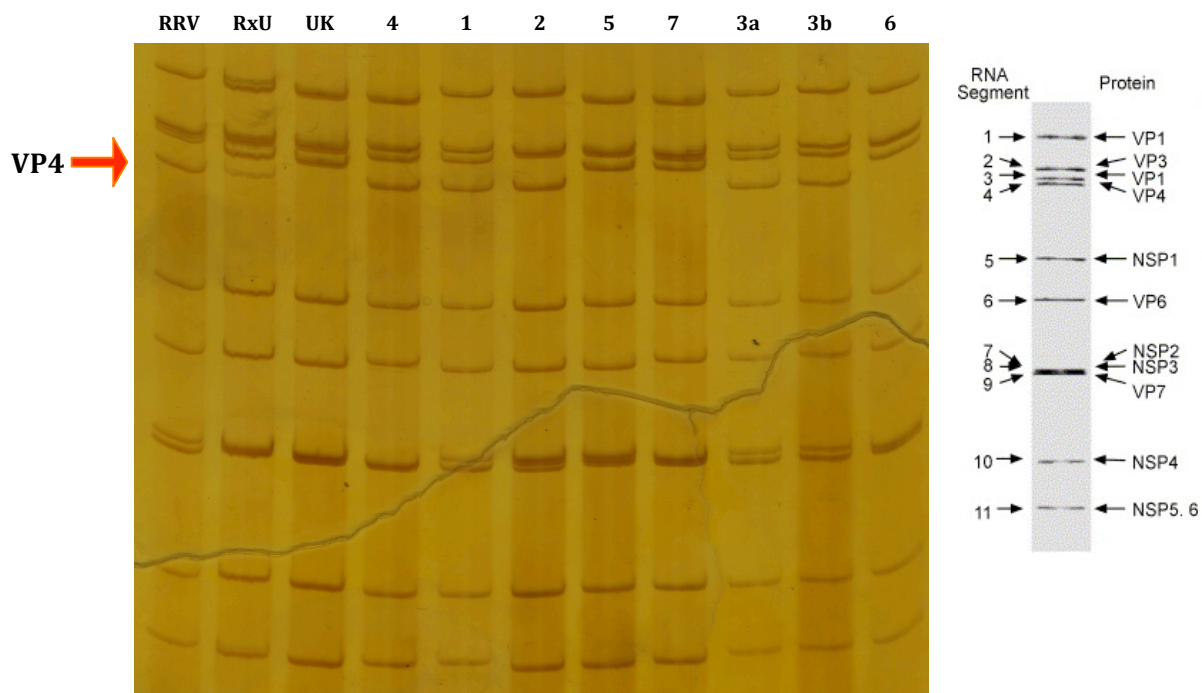


Figura 10. Confirmación del genotipo de las rearreglantes RRVxUK. Corrimiento electroforético del RNA genómico de las distintas rearreglantes empleadas en este estudio. El RNA se extrajo de lisados virales por el método de fenol-cloroformo, las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida y las bandas se evidenciaron por tinción de plata. De izquierda a derecha se cargaron las muestras de RNA como se indica: La cepa parental RRV; una mezcla 50:50 de la cepa RRV y de la cepa UK; la cepa parental UK; las rearreglantes de acuerdo al número indicado en la *Tabla 1*. Los carriles 3a y 3b indican dos lisados distintos de esta misma rearreglante.

Para corroborar el papel de la proteína VP4 de rotavirus de la cepa RRV en la resistencia a IFN tipo I, se evaluó la infectividad de las cepas Nar3, Nar14 y Nar18 en células MA104 estimuladas con IFN- α A/D. Estas cepas son variantes de la cepa RRV, pero tienen mutaciones puntuales en el gen codificante para la proteína de capa externa VP4, lo cual induce cambios estructurales en dicha proteína que a su vez modifican su vía de entrada a la célula. La mutante Nar3 no requiere de la interacción con ácidos siálicos para su entrada a las células, lo cual la hace resistente al tratamiento de las células antes de la infección con neuraminidasa; enzima que cataliza la hidrólisis de ácidos siálicos presentes en glicanos de la superficie celular [Kim et al., 2011]; de hecho Nar3 fue producida al realizar varios pases de la cepa RRV en células tratadas con neuraminidasa [Mendez et al., 1993]. Por el contrario, la cepa parental RRV, debido a su requerimiento de ácidos siálicos, es sensible a dicho tratamiento. Por otro lado, las revertantes Nar14 y Nar18, las cuales derivan de la cepa Nar3, también dependen de la presencia de ácido siálico para unirse a las células y son sensibles

a neuraminidasa [Mendez et al., 1996]. Las mutaciones en VP4 de la cepa Nar3 se encuentran en los siguientes aminoácidos: 37 (Leu a Pro), 187 (Lys a Arg), y 267 (Tyr a Cys). Mientras que las revertantes Nar14 y Nar18 conservan la lisina original en la posición 187 y tienen las mutaciones en los aminoácidos 37 y 267 al igual que Nar3.

Inicialmente se evaluó el requerimiento de ácidos siálicos terminales en la entrada de RRV, Nar3, Nar14 y Nar18. Para esto, se realizaron ensayos de infectividad en células tratadas con Neuraminidasa. Se corroboró el fenotipo, en el cual la infectividad de RRV y de las revertantes Nar14 y Nar18 disminuye drásticamente con el tratamiento de las células con neuraminidasa, mientras que la infectividad de la mutante Nar3, por el contrario aumenta en un 30% aproximadamente (**fig. 11**).

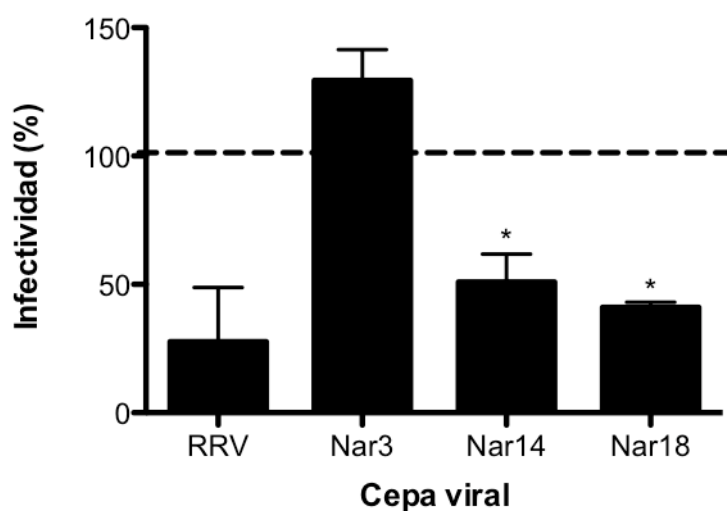


Figura 11. RRV, Nar14 y Nar18, pero no Nar3, requieren de ácidos siálicos terminales para su entrada a las células. Porcentaje de infectividad de la cepa parental RRV, la mutante Nar3 y las revertantes Nar14 y Nar18, obtenido en células MA104 tratadas con neuraminidasa a una concentración de 80mU/ml. Los datos se normalizaron a 100% con respecto a células no tratadas, indicado por la línea punteada. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de dos experimentos independientes (n=2) por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la infectividad de cada cepa en células tratadas con neuraminidasa y en células no tratadas (* $P \leq 0.05$).

Debido a que estas variantes tienen cambios en la proteína VP4, se decidió caracterizar su fenotipo con respecto a su sensibilidad a IFN tipo I; se encontró que independientemente de su sensibilidad o resistencia a neuraminidasa, Nar3, Nar14 y Nar18, resultaron ser sensibles a IFN (**fig. 12**). Probablemente si VP4 de la cepa RRV es la responsable del fenotipo de resistencia a IFN tipo I, una de las mutaciones en común en los aminoácidos 37 (Leu a Pro) y/o 267 (Tyr a Cys) les confiere este fenotipo. Es interesante explorar estos hallazgos con otras estrategias y determinar el mecanismo mediante el cual VP4 de la cepa RRV ayuda a sobrepasar los efectos de IFN tipo I durante la infección rotavirus.

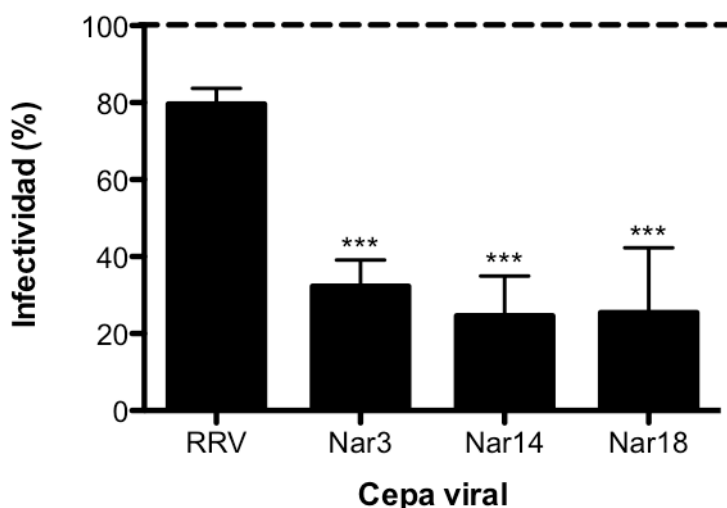


Figura 12. Nar3, Nar14 y Nar18, pero no RRV, son sensibles a IFN- α A/D. Porcentaje de infectividad de la cepa parental RRV, la mutante Nar3 y las revertantes Nar14 y Nar18, obtenido en células MA104 a 16 horas post-tratamiento con IFN- α A/D a una concentración de 500U. Los datos se normalizaron a 100% con respecto a células no tratadas con IFN, indicado por la línea punteada. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3) por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la infectividad de cada cepa en células tratadas con interferón y en células no tratadas (***) ($P \leq 0.001$).

Finalmente, para determinar si el papel de la proteína VP4 en la resistencia a IFN tipo I se conserva en otras cepas de rotavirus, se evaluó la infectividad de la cepa porcina YM en células estimuladas con IFN tipo I. Debido a que se encontró que YM al igual que UK es sensible a IFN tipo I, también se evaluó la infectividad de rearreglantes de RRV y YM (**Tabla 3**). Sin embargo, a diferencia del fenotipo encontrado usando las rearreglantes de RRV y UK; con las rearreglantes de RRV y YM no se logró encontrar un fenotipo claro de sensibilidad o resistencia a IFN

tipo I dado por proteínas virales específicas (**fig. 13**). Probablemente el mecanismo de inhibición de la infección sea distinto entre las distintas cepas que son sensibles a esta molécula antiviral. Se requiere de futuros estudios para entender la inhibición de la infectividad de la cepa porcina YM por IFN tipo I.

Tabla 3. Genotipo de rearreglantes de las cepas de rotavirus RRV (simio) y YM (porcino) empleadas en este estudio.

	Gene 1	Gene 2	Gene 3	Gene 4	Gene 5	Gene 6	Gene 7	Gene 8	Gene 9	Gene 10	Gene 11
RRV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
YM	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	R	R	R	R	Y	R	R	R	R	R	R
2	R	R	R	Y	R	R	R	R	R	R	R
3	R	R	R	Y	R	R	R	R	Y	R	R
4	Y	Y	Y	Y	R	Y	Y	Y	Y	Y	Y
5	Y	Y	Y	Y	Y	Y	R	Y	Y	Y	Y

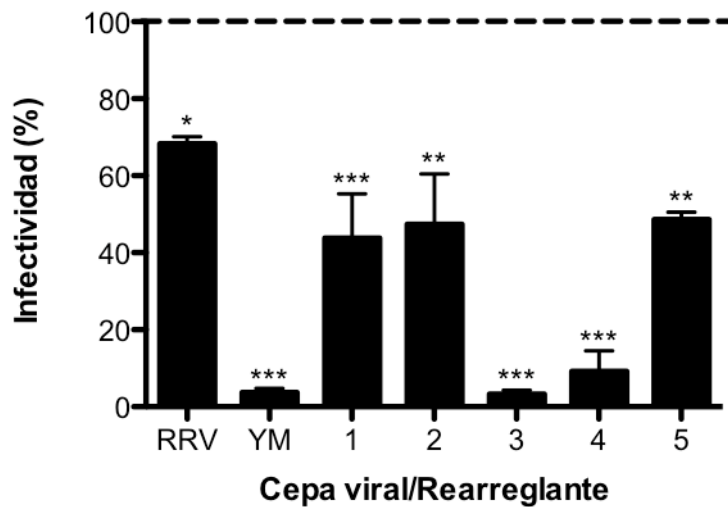


Figura 13. La sensibilidad a IFN tipo I de la cepa YM es un proceso multigénico. Porcentaje de infectividad de las cepas RRV, YM y de rearreglantes de estas cepas (presentadas en orden numérico; ver genotipo correspondiente en *Tabla 3*) obtenido en células MA104 a 16 horas post-tratamiento con IFN- α A/D empleando una concentración de 500U. Los datos se normalizaron a 100% con respecto a células no tratadas con IFN, indicado por la línea punteada. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3) por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la infectividad de cada virus en células tratadas con interferón y no tratadas (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

Evaluación de la permisividad de distintas líneas celulares a la infección.

7.3 Determinación del título de rotavirus de las cepas RRV y UK en distintas líneas celulares.

La línea celular MA104 se emplea comúnmente como modelo para estudiar el ciclo infeccioso de rotavirus. Con la finalidad de encontrar una línea con mayor o menor permisividad a la infección con rotavirus que MA104, se determinó el título viral de las cepas RRV y UK en las líneas celulares Caco-2, L929 y HUH 7.5.1. En la **figura 14**, se presenta un ensayo realizado con un lisado viral de título: $2.00E+08$ y $5.40E+006$ para RRV y UK, respectivamente, obtenido en la línea celular de referencia MA104. Se puede observar que en todas las líneas celulares probadas, el título viral disminuye con respecto a MA104. Sin embargo, el título obtenido en la línea celular L929, tanto para RRV como para UK, es aproximadamente dos logaritmos menor que en MA104; lo cual indica que esta línea es un buen candidato para evaluar si es menos permisiva a la infección con rotavirus en fases posteriores a la entrada. Por el contrario, en las líneas HUH 7.5.1 y Caco-2 el título viral es similar al obtenido en MA104.

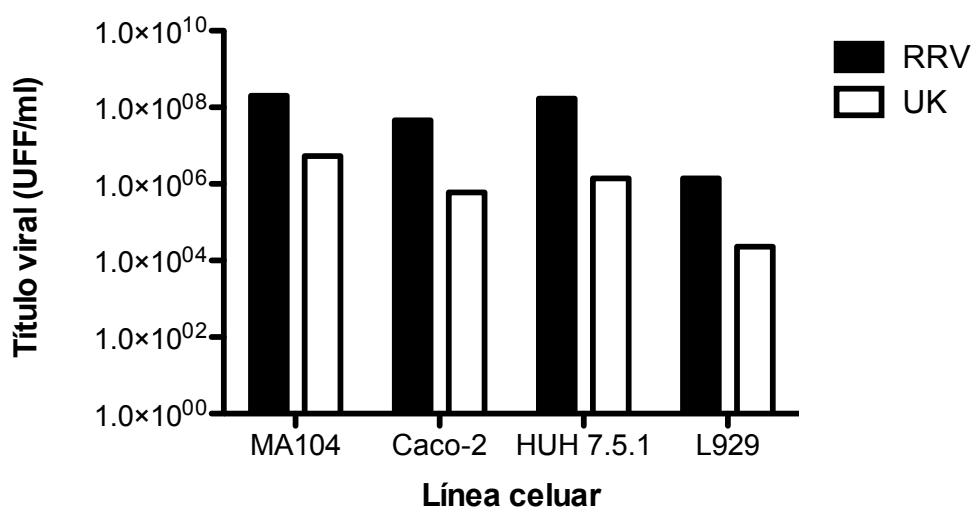


Figura 14. Las líneas celulares Caco-2, HUH 7.5.1 y L929 son menos permisivas a la infección que MA104. Título viral de partículas de triple capa (TLPs) de las cepas RRV y UK, representado como unidades formadoras de foco por mililitro (UFF/ml), en las líneas celulares MA104, Caco-2, HUH 7.5.1 y L929. Los datos presentados son representativos de un ensayo, el ensayo fue realizado tres veces con distintos lisados virales de cada una de las cepas.

En la **figura 15**, se presenta el número de veces que disminuye el título viral de RRV y UK en las distintas líneas celulares en comparación con MA104. Es decir, el título viral obtenido en MA104 dividido entre el título viral obtenido en cada una de las líneas celulares. Como se puede observar, la diferencia en la línea Caco-2 es de menos de 10 veces. En HUH 7.5.1, el título es similar al obtenido en MA104, siendo sólo 0.5 veces menor en el caso de RRV y 3 veces el en caso de UK. Sólo se encontraron diferencias significativas (***) en el número de veces que disminuye el título en las células L929, siendo aproximadamente 150 veces menor que en MA104, tanto en el caso de UK como de RRV.

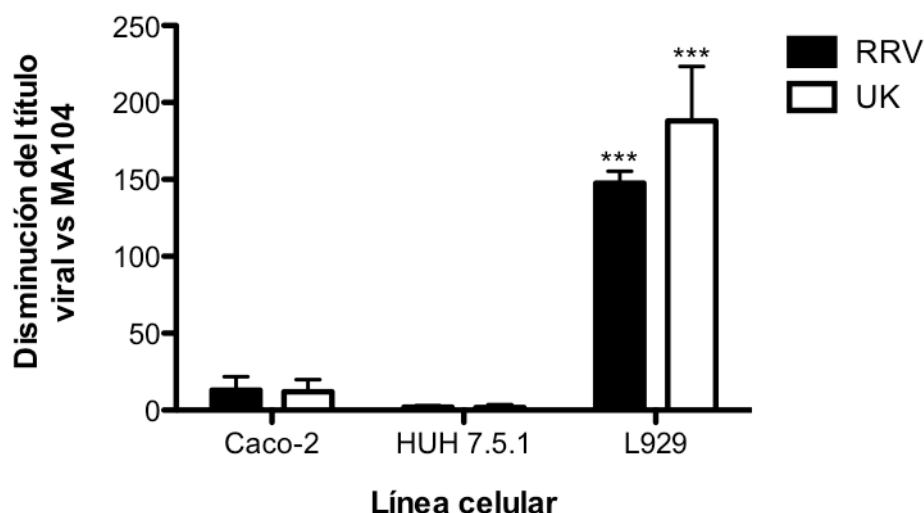


Figura 15. La línea celular L929 es muy poco permisiva a la infección con rotavirus. Número de veces que disminuye el título viral de las cepas RRV y UK en distintas líneas celulares con respecto a MA104, el cual se obtuvo dividiendo el título en MA104 entre el título obtenido en las líneas Caco-2, HUH 7.5.1 y L929 respectivamente. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3) por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la infectividad viral en cada línea celular con respecto a la línea celular MA104 (***) ($P \leq 0.001$).

7.4 Lipofección de partículas virales de doble capa en células poco permisivas a la infección.

Con la finalidad de determinar si el bajo título obtenido al infectar con rotavirus de las cepas UK y RRV a células L929, es debido a la incapacidad del virus para entrar a las células o a factores endógenos que impiden su replicación, se

llevaron a cabo ensayos de lipofección de partículas virales de doble capa (DLPs) en células MA104 y L929.

En la **figura 16** se muestra el número de focos infecciosos obtenidos al lipofectar con partículas de doble capa de las cepas RRV y UK en las líneas celulares MA104 y L929. Se puede observar que el número de focos infecciosos al lipofectar DLPs de ambas cepas es similar en ambas líneas celulares, aún cuando la línea celular L929 se infecta alrededor de 150 veces menos que MA104 con TLPs. Esto sugiere que el bloqueo en la infección de células L929 es principalmente a nivel de entrada y que sobrepasando esta barrera estas células son tan permisivas a la infección como células MA104.

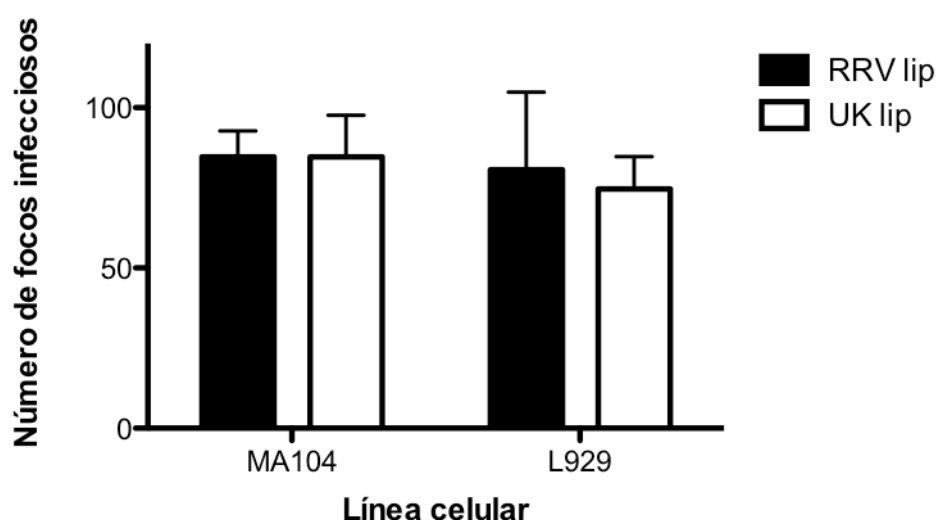


Figura 16. La permisividad de las líneas celulares MA104 y L929 es similar en etapas posteriores a la entrada. Número de focos infecciosos obtenidos al transfectar partículas virales de doble capa (DLPs) de rotavirus de las cepas RRV y UK en células MA104 y L929. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3) por triplicado. No se encontraron diferencias significativas entre la infectividad de cada virus en las diferentes líneas celulares.

7.5 Lipofección de partículas virales de doble capa en la línea celular HUH 7.5.1.

La línea celular HUH 7.5.1 es uno de los modelos celulares utilizados actualmente para el estudio del virus de hepatitis C (HCV)(Bartenschlager & Pietschmann, 2005; Zhong et al., 2005). Esta clona se generó a partir de otra

denominada HUH 7.5, mediante la transfección de replicones del genoma de HCV y la posterior eliminación de estos mediante el tratamiento con IFN (Zhong et al., 2005). La clona HUH 7.5 posee mutaciones en el dominio CARD de RIG-I; asimismo, esta línea al igual que otras líneas celulares hepáticas expresan bajos niveles de TLRs (Bartenschlager & Pietschmann, 2005; Sumpter et al., 2005).

Las características de la línea HUH 7.5.1 y los datos obtenidos previamente, en donde se determinó que rotavirus se replica muy bien en esta línea celular, con títulos apenas 3 veces menores que en MA104 en el caso de UK y 0.5 veces menor para RRV, sugieren que esta línea celular podría ser altamente permisiva a la infección con rotavirus en fases posteriores a la entrada. Debido a esto, se realizaron ensayos de lipofección de partículas de doble capa de las cepas RRV y UK. Se determinó que la cantidad de focos infecciosos en HUH 7.5.1 es significativamente mayor que en MA104 ($***P \leq 0.001$); alrededor de 6 veces más en el caso de RRV y 3 veces más en el caso de UK (**fig. 17**). Esto sugiere que, en etapas posteriores a la entrada, el ciclo replicativo viral se lleva a cabo de manera más eficiente en la línea HUH 7.5.1 que en MA104.

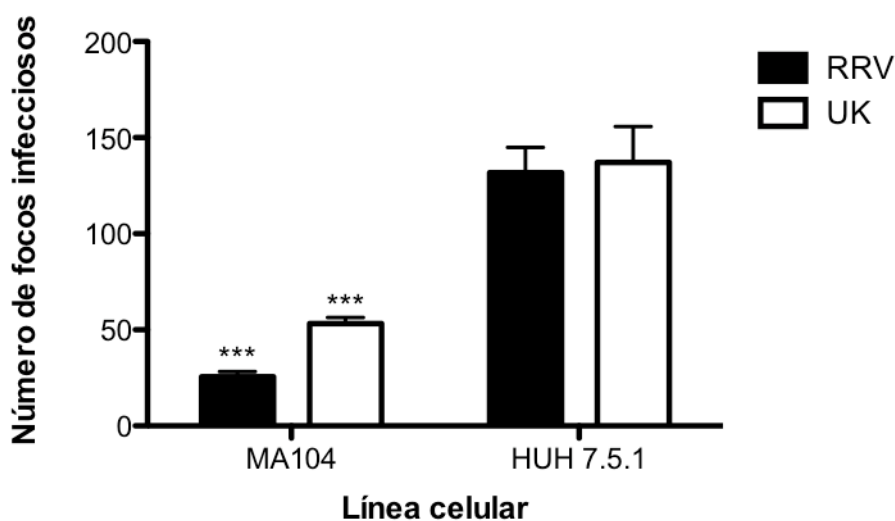


Figura 17. La línea celular HUH 7.5.1 es altamente permisiva en etapas posteriores a la entrada. Número de focos infecciosos obtenidos al transfectar partículas virales de doble capa (DLPs) de rotavirus de las cepas RRV y UK en células MA104 y HUH 7.5.1. Se muestran las medias aritméticas más desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3) por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la infectividad de cada virus en células MA104 y HUH 7.5.1 ($***P \leq 0.001$).

Para descartar que la diferencia en el número de focos infecciosos obtenidos fuese debido a variaciones en la eficiencia de transfección entre ambas líneas celulares, se llevó a cabo un control de transfección utilizando un plásmido que expresa a la proteína verde fluorescente (GFP). No se encontraron diferencias significativas entre el número de células que expresan GFP en células MA104 y HUH 7.5.1 (**fig. 18**); lo cual indica que ambas células se transfectan con una eficiencia similar.

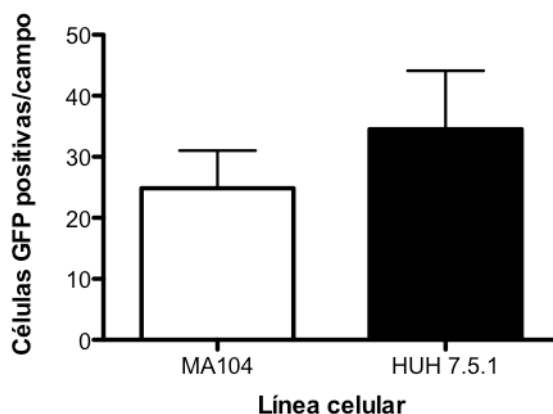


Figura 18. La eficiencia de transfección de las líneas celulares HUH 7.5.1 y MA104 es similar. Número de células que expresan GFP al ser tratadas con 500ng/pozo-48 de plásmido pcDNA3.1-GFP. Las medias aritméticas más desviación estándar se obtuvieron de tres experimentos independientes (n=3) contando 20 campos en cada experimento. No se encontraron diferencias significativas en la eficiencia de transfección

7.6 Cinética de replicación de rotavirus en células HUH 7.5.1.

Para caracterizar el ciclo replicativo y la producción de partículas infecciosas de rotavirus de las cepas RRV y UK en células HUH 7.5.1, se llevó a cabo una cinética en donde se infectaron células HUH 7.5.1 y MA104 a una MOI de 3 y la producción de progenie viral se cuantificó a las 2, 4, 6 y 8 horas post infección en células MA104. Como se puede observar en las **figuras 19 y 20**, la producción de partículas infecciosas de la cepa UK a las horas estudiadas es similar en ambas líneas celulares, sin embargo en el caso de la cepa RRV hay más variaciones, sobre todo en tiempos intermedios (4 y 6 horas post-infección). Esto puede deberse a la cinética del ciclo replicativo, incluyendo la capacidad de entrada del virus en ambas líneas celulares. Es interesante evaluar la producción de progenie viral infecciosa a tiempos más avanzados del ciclo replicativo. Cabe mencionar

que estos experimentos se realizaron a una multiplicidad de infección de 3 con respecto a la línea celular MA104 y se empleó la misma cantidad de virus para infectar células HUH 7.5.1, se requiere realizar estos estudios ajustando la MOI a la línea celular HUH 7.5.1, la cual se infecta menos que MA104.

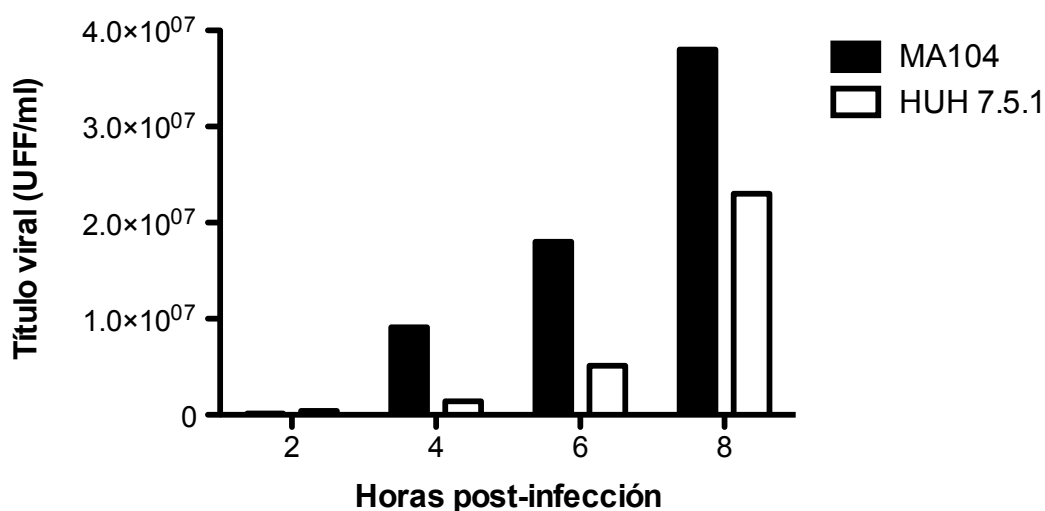


Figura 19. La producción de progenie viral de la cepa RRV es mayor en la línea celular MA104 que en HUH 7.5.1. Histograma representativo de la producción de partículas virales infecciosas de la cepa RRV en las líneas celulares MA104 y HUH 7.5.1. Las infecciones se llevaron a cabo a una multiplicidad de infección (MOI) de 3. Se cosecharon los lisados virales a 2, 4, 6 y 8 horas post-infección y posteriormente se midió el título viral de cada lisado, el cual se expresa como Unidades Formadoras de Foco (UFF)/ml. Este experimento se realizó una vez (n=1) por triplicado.

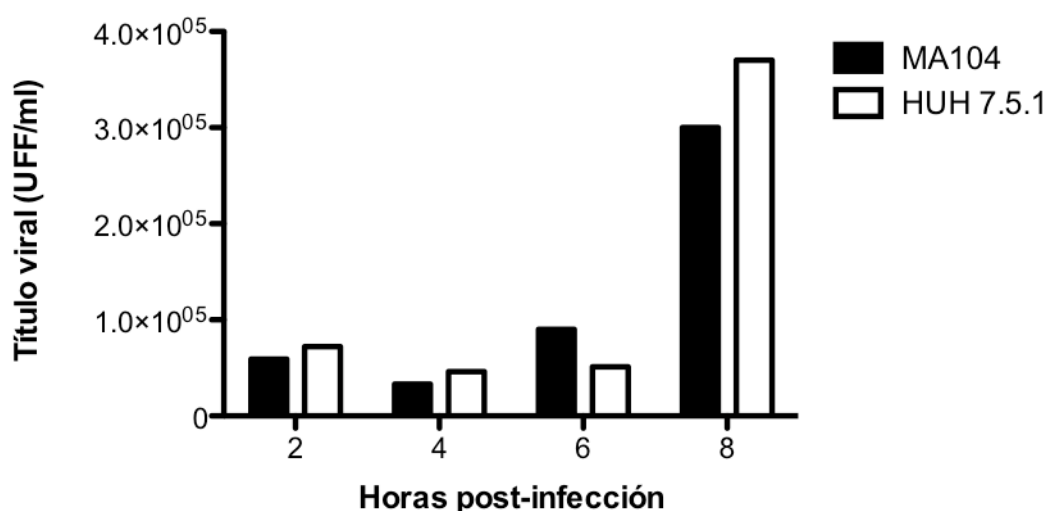


Figura 20. La producción de progenie viral de la cepa UK es similar en la línea celular MA104 que en HUH 7.5.1. Histograma representativo de la producción de partículas virales infecciosas de la cepa UK en las líneas celulares MA104 y HUH 7.5.1. Las infecciones se llevaron a cabo a una multiplicidad de infección (MOI) de 3. Se cosecharon los lisados virales a 2, 4, 6 y 8 horas post-infección y posteriormente se midió el título viral de cada lisado, el cual se expresa como Unidades Formadoras de Foco (UFF)/ml. Este experimento se realizó una vez (n=1) por triplicado.

7.7 Evaluación de síntesis de proteínas en células HUH 7.5.1 infectadas con rotavirus.

En células MA104 infectadas con rotavirus se inhibe severamente la síntesis de proteínas celulares, sin embargo la síntesis de proteínas virales no se ve afectada (Montero et al., 2008). Para estudiar la síntesis de proteínas celulares y virales en la línea celular HUH 7.5.1 durante la infección con rotavirus, se decidió evaluar su producción mediante experimentos de pulzo y caza. En la **figura 21**, se presenta una autoradiografía de un gel de poliacrilamida en donde se corrieron muestras de lisados de células infectadas con rotavirus de la cepa RRV a una MOI de 5, tratadas por 1 h con MEM^{Met-/-} suplementado con μ 25 Ci/ml de Easy-tag express-[³⁵S] antes de la cosecha, la cual se realizó a las 6 horas post-infección. Como controles positivos de inhibición de la síntesis de proteínas se transfectaron células con RNA de doble cadena (dsRNA), un activador de la cinasa PKR; y se trataron células con Tapsigargina, una droga que activa a la cinasa PERK; ambas cinasas inducen la fosforilación de eIF2 α , lo cual resulta en la inhibición de la síntesis de proteínas celulares. Como control negativo se muestran lisados de células no infectadas (*Mock Infected*, MI). Es importante notar que en células HUH 7.5.1 infectadas con RRV, no se observa una inhibición de la síntesis de proteínas en comparación con MA104. Este mismo efecto se observa al transfectar células de ambas líneas con dsRNA. Sin embargo, al tratar células HUH 7.5.1 con Tapsigargina, se abate completamente la síntesis de proteínas celulares, al igual que en células MA104. En conjunto estos resultados sugieren que en la línea celular HUH 7.5.1, se puede inhibir la producción de síntesis de proteínas por medio de la fosforilación de eIF2 α inducida por PERK, pero no por PKR, la cual se activa en respuesta a dsRNA y es la responsable de la fosforilación de eIF2 α durante la infección con rotavirus en células MA104 [Rojas et al., 2010].

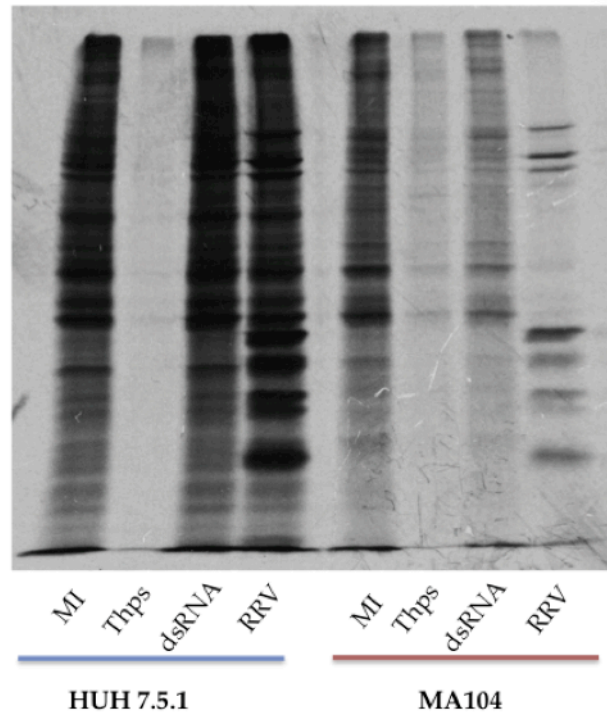


Figura 21. La síntesis de proteínas celulares no se inhibe en la línea celular HUH 7.5.1 durante la infección con rotavirus, pero sí mediante el tratamiento con Tapsigargina. Células HUH 7.5.1 y MA104 se sometieron a los siguientes tratamientos: a) Mock Infected (MI), b) Tapsigargina 1 μ M, c) Transfección de RNA de doble cadena (dsRNA) 500ng/pozo48 y d) Infección con rotavirus de la cepa RRV a MOI de 5. A las 6 horas post-infección/tratamiento, se realizó un marcaje metabólico por 30 min con μ 25 Ci/ml de Easy-tag express-[³⁵S]. La Tapsigargina se añadió 30 min antes del marcaje metabólico y se conservó durante este tratamiento (1h en total). Se cosecharon las células con RIPA, las proteínas marcadas radiactivamente se resolvieron en 10% SDS-PAGE y se detectaron por autoradiografía.

7.8 Evaluación de la fosforilación de eIF2- α en células HUH 7.5.1 infectadas con rotavirus.

Como resultado de diversos estímulos, se pueden activar cinasas que fosforilan al factor eucariote de inicio de la traducción eIF2- α , lo cual resulta en la inhibición de la síntesis de proteínas (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). La falta de inhibición de síntesis de proteínas en la línea celular HUH 7.5.1 durante la infección con rotavirus o al transfectar dsRNA, sugiere que algún componente de la vía de PKR no permite que eIF2 α se fosforile. Por esta razón, se decidió evaluar esta vía en células HUH 7.5.1 durante la infección. Se infectaron células de las líneas MA104 y HUH 7.5.1 a multiplicidades de infección de 1, 5 y 10. A las 6 horas post-infección se cosecharon las muestras y se realizaron ensayos de western blot, empleando anticuerpos contra eIF2 α fosforilado (eIF2 α -P), eIF2 α

total (eIF2 α), Proteína-cinasa R (PKR) y partículas virales de triple capa (TLPs). En la **figura 22** se puede observar que durante la infección no se detectó eIF2 α -P en células HUH 7.5.1. Sin embargo la cantidad de eIF2 α total es similar en todas las muestras. También se observa que la línea celular HUH 7.5.1 expresa bajos niveles de PKR, lo cual puede ser la causa de la falta de fosforilación de eIF2 α . Estos resultados sugieren de manera interesante que la regulación de la traducción durante la infección en células MA104 y HUH 7.5.1 podría ser diferente y que aún cuando eIF2 α no se fosforila y no se inhibe la síntesis de proteínas, rotavirus se puede replicar de manera eficiente.

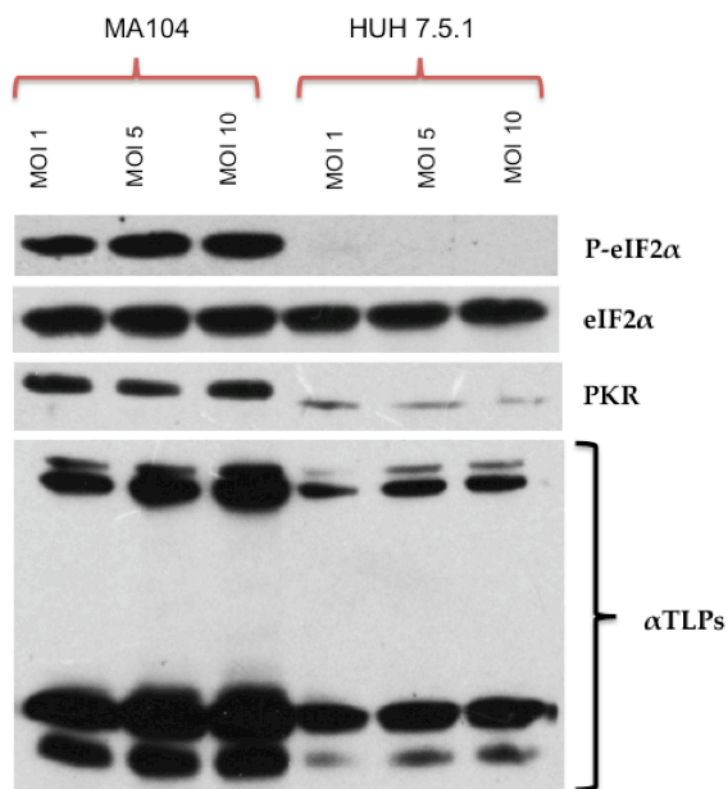


Figura 22. eIF2 α no se fosforila en la línea celular HUH 7.5.1 durante la infección con rotavirus, probablemente por la baja expresión de PKR en esta línea celular. Se infectaron células HUH 7.5.1 y MA104 con rotavirus de la cepa RRV a multiplicidades de infección de 1, 5 y 10. Se cosecharon las células con RIPA y las proteínas se resolvieron en 10% SDS-PAGE. Se analizaron las muestras por Western Blot empleando anticuerpos contra eIF2 α fosforilado (eIF2 α -P), eIF2 α total (eIF2 α), Proteína-cinasa R (PKR) y partículas virales de triple capa (TLPs).

7.9 Evaluación de la actividad del sistema 2'5'-OAS/RNasa L en células HUH 7.5.1.

Para continuar con la caracterización de la línea celular HUH 7.5.1 y los factores que determinan su alta permisividad a la infección con rotavirus en etapas posteriores a la entrada, se evaluó la actividad del complejo 2'5'-OAS/RNasa L. Para esto, se infectaron células HUH 7.5.1 y MA104 con virus de la cepa RRV a una MOI de 5. Como control positivo de la activación del complejo 2'5'-OAS/RNasa L se transfectaron células con RNA de doble cadena y como controles negativos se utilizaron células tratadas con lipofectamina o *mock infected*. Posteriormente se extrajo el RNA total y las muestras se analizaron en Nano Chips RNA 6000 utilizando el Bioanalyzer Agilent 2000 para evaluar la integridad de los RNAs ribosomales. No se detectó degradación de las subunidades 28S y 18S en células infectadas en la línea celular HUH 7.5.1, al igual que en la línea celular MA104, en la cual ya se había determinado previamente en el laboratorio que durante la infección con rotavirus la actividad de este complejo se encuentra inhibida (Sánchez et al., datos no publicados, y **fig. 23**).

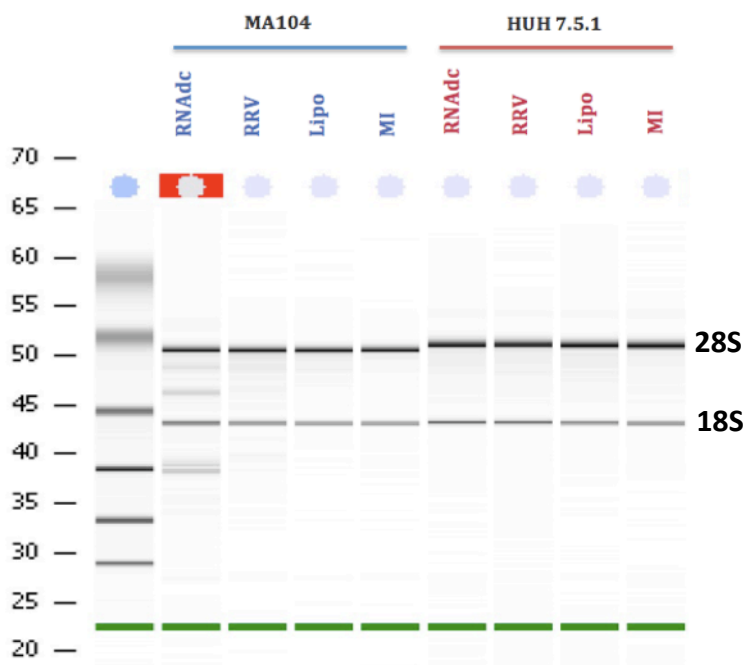


Figura 23. Evaluación de la integridad de los RNAs ribosomales. Células HUH 7.5.1 y MA104 se sometieron a los siguientes tratamientos: a) Transfección de RNA de doble cadena (dsRNA) a 500ng/pozo48, b) Infección con rotavirus de la cepa RRV a MOI de 5, c) Control de lipofectamina y d) Mock Infected (MI). Se cosecharon las muestras y se extrajo el RNA total, el cual se analizó mediante la plataforma basada en microfluidos Agilent 2100 Bioanalyzer, para evaluar la integridad de los RNAs ribosomales 28S y 18S. El primer carril izquierdo corresponde al marcador de pesos moleculares y los carriles subsecuentes las muestras en el orden indicado.

Un hallazgo muy interesante fue que en células HUH 7.5.1 no hubo degradación de RNAs ribosomales cuando se transfectaron con RNA de doble cadena. Esto indicaba que en esta línea celular el complejo 2'5-OAS/RNasa L no se encuentra activo, lo cual podía ser debido a que estas células *per se* no expresan componentes de este sistema antiviral o debido a que el sistema fue alterado durante el proceso de selección de la clona a partir de células HUH 7.5. Mientras se exploraban estos hallazgos, se reportó que la línea celular HUH 7.5.1 no expresa RNasa L [Kwon et al., 2013], lo cual explica la ausencia de degradación de RNAs ribosomales en esta línea celular.

VIII. Discusión

Diversos factores determinan la eficiencia del ciclo replicativo viral en una célula. Algunos de estos incluyen: la presencia de receptores celulares adecuados para la unión y entrada de las partículas virales a las células hospederas, el control eficiente de la maquinaria de traducción y de varios sistemas importantes para el funcionamiento celular, así como mecanismos inherentes a la inhibición de la respuesta antiviral para lograr una infección productiva. Este proyecto se llevó a cabo con la finalidad de entender la participación de algunos sistemas antivirales durante la infección con rotavirus.

Una parte de este trabajo se enfocó en la caracterización del ciclo infeccioso de rotavirus en células MA104 estimuladas con IFN tipo I. Si bien se ha demostrado que algunas cepas de rotavirus poseen mecanismos para bloquear la producción de IFN [Barro et al., 2007; Graff et al., 2009], aún así se produce una cantidad significativa de esta molécula antiviral durante la infección con distintas cepas de rotavirus en modelos celulares [Holloway et al., 2009; Sen et al., 2011], animales [La Bonnardiere et al., 1981; Pott et al., 2011; Sen et al., 2012] y en humanos [De Boissieu et al., 1993]. Además, se ha demostrado en varios estudios que los interferones restringen la replicación de rotavirus y disminuyen el rendimiento viral en heces de ratones [Broquet et al., 2011; Frias et al., 2011; Pott et al., 2011; Sen et al., 2011; Sen et al., 2012].

En el presente trabajo se encontró que la infectividad de la cepa bovina UK en células MA104 se ve altamente restringida mediante el tratamiento con IFN- α /D, con alrededor de un 90% de inhibición; por el contrario, la infectividad de rotavirus de la cepa de simio RRV fue escasamente afectada. Estos resultados coinciden con reportes que indican que cepas homólogas al organismo al que infectan se replican de manera más eficiente que cepas heterólogas [Ciarlet et al., 1998; Feng et al., 2008]. En fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), la replicación de rotavirus de las cepas UK (bovina), NCDV (bovina) y OSU (porcina) se ve altamente restringida, mientras que rotavirus de las cepas ETD (murina) y EHP (murina) se replican de manera eficiente en esta línea celular [Feng et al., 2009]. De manera interesante, en el trabajo de Feng et al., se encontró que la replicación de la cepa heteróloga de rotavirus de simio RRV es

similar a la de cepas murinas; evento asociado a la capacidad de degradación del factor de respuesta a interferón 3 (IRF-3) mediado por la proteína viral NSP1. De hecho, la secuencia de aminoácidos de NSP1 de RRV tiene un alto porcentaje de identidad con respecto a la NSP1 de cepas murinas, por el contrario, la secuencia de la NSP1 de cepas bovinas o porcinas tiene un porcentaje de identidad mucho menor con la cepa RRV [Dunn et al., 1994]. Se sugiere que esta homología de secuencias determina la capacidad de degradación de IRF-3 [Feng et al., 2009], sin embargo este hallazgo no ha sido fehacientemente demostrado.

Dado el papel bien establecido de NSP1 en la degradación de IRF3 en MEFS, parecería consistente que la baja replicación de UK en esta línea celular es debido a la incapacidad de esta cepa para inhibir la producción de IFN, mientras que la elevada replicación de rotavirus de la cepa RRV se asociaría a la inhibición efectiva de la producción de IFN, como se ha propuesto recientemente [Feng et al., 2009]. Sin embargo, nuestros resultados indican que aunado a la inhibición de la producción de IFN, existe un bloqueo cepa-dependiente de la infectividad de rotavirus mediado por moléculas efectoras inducidas por IFN tipo I, como se ha descrito para otros virus [Schoggins et al., 2011]. Esto implica que, al menos en la línea celular MA104, rotavirus de la cepa RRV tiene la capacidad de controlar los mecanismos antivirales inducidos por IFN tipo I, mientras que la cepa bovina UK no posee dichas características.

Mediante una aproximación sencilla y directa, se evaluó la participación de las proteínas de capa externa de rotavirus en la resistencia a IFN tipo I. Se transfectaron partículas virales de doble capa (DLPs); las cuales son transcripcionalmente activas pero carecen de las proteínas externas VP4 y VP7. Se encontró que rotavirus de la cepa RRV resultó ser sensible al tratamiento con IFN en ausencia de estas proteínas estructurales, disminuyendo su infectividad en alrededor del 90%, al igual que la cepa bovina UK. Este hallazgo sugiere que una o ambas proteínas de la capa externa de rotavirus de la cepa RRV podría ser responsable de antagonizar alguna(s) molécula(s) efectoras de la respuesta a IFN tipo I al inicio de la infección. Aunque existe la posibilidad de que la vía endocítica que sigue cada una de estas cepas sea determinante de la resistencia/sensibilidad a IFN tipo I.

Se ha demostrado que la infectividad de rotavirus de la cepa Wa disminuye drásticamente en células de epitelio intestinal (Caco-2 y HT-29) estimuladas con IFN alfa (tipo I) o gamma (tipo II) [Bass DM, 1997]. Este reporte y nuestros resultados demuestran que la capacidad infecciosa de distintas cepas de rotavirus en células en *estado antiviral* puede variar dependiendo de la cepa empleada. No obstante, nuestros resultados y los de Bass DM, indican que las cepas Wa, RRV, y UK, son sensibles a IFN tipo I una vez que han perdido las proteínas de capa externa VP4 y VP7. En este mismo reporte, se evaluó el efecto de IFN tipo II en la infectividad de rotavirus de la cepa Wa y se determinó que dicha cepa también es sensible a esta molécula antiviral, sin embargo cuando se transfectaron partículas virales de doble capa en células estimuladas con IFN tipo II, la infectividad no disminuyó [Bass DM, 1997]. Este hallazgo sugiere que la expresión diferencial de genes estimulados por interferón tipo I y II afecta de distinta manera la infectividad de rotavirus. Sería interesante evaluar el efecto de los tres tipos de IFN (I, II y III) en la infectividad de partículas virales completas y de doble capa de distintas cepas. El resultado de estos estudios muy probablemente ayudaría a entender algunos mecanismos antivirales inducidos por IFN que afectan el ciclo replicativo de rotavirus.

Una estrategia para identificar un gen viral responsable de algún evento característico del ciclo replicativo que ocurre de manera cepa dependiente; es el uso de rearreglantes entre las cepas en las cuales se encuentran dichas diferencias. En estudios previos, empleando rearreglantes entre algunas cepas de rotavirus en distintos modelos animales, se ha descrito que las diferencias en los niveles de replicación, producción de progenie viral y/o virulencia de distintas cepas es un fenómeno que implica más de una proteína viral [Offit et al., 1986; Broome et al., 1993; Hoshino et al., 1995; Bridger et al., 1998; Ciarlet et al., 1998; Feng et al., 2011; Wang et al., 2011; Feng et al., 2013]. En cada uno de estos estudios fueron empleadas distintas condiciones, incluyendo distintos modelos animales y cepas virales, así como rearreglantes con una combinación muy variada de genes. En la gama de estudios realizados al respecto, se han asociado varias proteínas estructurales como VP3, VP4 y VP7, así como las proteínas no estructurales NSP1, NSP2 y NSP4 con la eficiencia del ciclo replicativo de

rotavirus [Offit et al., 1986; Broome et al., 1993; Hoshino et al., 1995; Bridger et al., 1998; Ciarlet et al., 1998; Feng et al., 2011; Wang et al., 2011; Feng et al., 2013].

La mayoría de estos estudios se han realizado en modelos animales, en los cuales es complicado determinar el nivel al que una proteína viral actúa de manera específica. Empleando rearreglantes de rotavirus en células en cultivo estimuladas con IFN es posible estudiar el papel de las proteínas virales en el antagonismo de la respuesta a IFN. En el presente trabajo, se encontró que hay una correlación entre la sensibilidad a IFN de las rearreglantes UK-RRV 5, 6 y 7, las cuales tienen los segmentos 3 (VP3), 4 (VP4) y 8 (NSP2) de la cepa UK y la resistencia de las rearreglantes 1, 2, 3 y 4, que tienen segmentos equivalentes de la cepa RRV.

En los ensayos de transfección de DLPs, se encontró que muy probablemente una de las proteínas de capa externa puede ser la responsable la resistencia a IFN tipo I. En conjunto, estos datos sugieren que la proteína VP4 de la cepa RRV probablemente es la responsable del fenotipo de resistencia para sobrepasar el “estado antiviral” de las células estimuladas con IFN tipo; ya que se encontró una correlación entre el fenotipo de resistencia observado y el gen 4 de RRV, el cual codifica la proteína VP4. Sin embargo se requieren más estudios para corroborar el papel de VP4 y excluir a los genes 3 y 8. Para esto, se propone emplear una rearreglante que posee todos los genes de RRV excepto el gen 4, la cual se encuentra en proceso de purificación en el laboratorio.

La variante Nar3, obtenida a partir de la cepa RRV, tiene mutaciones en el gen que codifica para VP4, lo cual la hace independiente de ácidos siálicos durante el proceso de entrada [Mendez et al., 1993]. Por otro lado, Nar14 y Nar18, que fueron seleccionadas a partir de Nar3, poseen una reversión de la arginina 187 a lisina, lo cual les confiere un fenotipo de dependencia de ácidos siálicos similar al de la cepa silvestre RRV [Mendez et al., 1996]. Recientemente se demostró en nuestro laboratorio que estas mutaciones en VP4, también son determinantes en la vía endocítica empleada por rotavirus [Díaz-Salinas et al., 2013]. En este trabajo se evaluó la infectividad de Nar3, Nar14 y Nar18 en células estimuladas

con IFN tipo I. Se demostró que todas las variantes son sensibles a esta molécula antiviral. La explicación más factible a este resultado, es que una de las mutaciones en común en el gen codificante para VP4, les confiere este fenotipo (con excepción de la arginina/lisina, en la posición 187, la cual difiere entre la mutante Nar3 y las revertantes Nar14 y Nar18). Sin embargo, estas tres variantes poseen el gen 5 de rotavirus de la cepa humana DS1 [Mendez et al., 1996], lo cual podría considerarse como la causa de la sensibilidad a IFN tipo I. Esto es poco probable debido a lo siguiente: a) La capacidad/incapacidad de rotavirus de la cepa DS1 de degradar a los factores de respuesta a interferón (IRFs) en células tratadas con IFN y células no tratadas es la misma en ambas condiciones, lo cual funciona como un control interno, b) En los experimentos realizados en este trabajo, las células se encuentran en *estado antiviral*, siendo muy probable que diversos ISGs sean responsables de la restricción a este nivel y no la producción de IFN adicional provocada por la ausencia de degradación de IRF3 mediante la proteína NSP1 de la cepa DS1 [Arnold & Patton, 2011], c) Experimentos realizados en el laboratorio (*fig 3 de resultados*) indican que el tratamiento con IFN tipo I después de la infección (en células previamente tratadas con interferón), no produce una diferencia significativa en la inhibición de la infectividad y d) No existe ninguna correlación con el gen 5 en los experimentos realizados con las rearreglantes RRVxUK.

Adicionalmente, en este proyecto se realizaron los mismos estudios empleando rearreglantes entre rotavirus de la cepa porcina YM y la cepa de simio RRV. A diferencia del fenotipo encontrado usando las rearreglantes de UK, con las rearreglantes de YM no se logró encontrar una correlación clara entre el genotipo y el fenotipo de resistencia a IFN tipo I. Muy probablemente el mecanismo de inhibición de la infección es distinto entre las distintas cepas que son sensibles a esta molécula antiviral, siendo probablemente de carácter multigénico en el caso de YM.

Las interacciones entre las dos proteínas de capa externa de rotavirus puede alterar la especificidad de unión a receptores celulares [Mendez et al., 1996]. Existe la posibilidad de que la interacción de la proteína VP4 con VP7 determine la resistencia a IFN y probablemente la interacción entre estas proteínas de la

cepas UK y RRV es distinta a la de las cepas YM y RRV. Se requieren futuros estudios para caracterizar el papel de las proteínas virales de YM y de otras cepas en la resistencia/sensibilidad a IFN tipo I.

La segunda parte de este proyecto, se centró en la evaluación de la permisividad de distintas líneas celulares a la infección con rotavirus. Se evaluó la infectividad de TLPs de las cepas UK y RRV en las líneas celulares MA104, Caco-2 y L-929. Los títulos obtenidos variaron de manera considerable entre cada línea celular, con diferencias de hasta 150 veces en el caso de la línea celular L-929. Sin embargo al transfectar DLPs de estas mismas cepas virales, la cantidad de focos infecciosos fue muy similar en todos los casos. Estos resultados concuerdan con reportes previos en los que se evaluó la infectividad de TLPs y DLPs de diversas cepas virales en una amplio repertorio de líneas celulares [Bass et al., 1992; Ciarlet et al., 2002]. En conjunto, estos datos indican que el bloqueo principal en el ciclo replicativo de rotavirus se presenta durante la fase de entrada de las partículas virales a su célula hospedera.

La línea celular HUH 7.5.1 es uno de los modelos celulares utilizados actualmente para el estudio del virus de hepatitis C (HCV)(Bartenschlager & Pietschmann, 2005; Zhong et al., 2005). Esta clona se generó a partir de otra denominada HUH 7.5, mediante la transfección de replicones del genoma de HCV y la posterior eliminación de estos mediante el tratamiento con interferón (IFN)(Zhong et al., 2005). La clona HUH 7.5 posee mutaciones en el dominio CARD de RIG-I, asimismo se ha determinado que esta línea, al igual que otras líneas celulares hepáticas expresan bajos niveles de TLRs (Bartenschlager & Pietschmann, 2005; Sumpter et al., 2005).

Los sistemas antivirales defectivos en HUH 7.5.1 nos permitieron hipotetizar que esta línea celular sería altamente permisiva a la infección con rotavirus; por lo cual, se llevaron a cabo ensayos de infectividad con TLPs y DLPs de la cepas UK y RRV en esta línea celular. Se determinó que esta línea es altamente permisiva a la infección en pasos posteriores a la entrada. Posteriormente, con la finalidad de explorar si otros mecanismos antivirales se encontraban defectivos, se evaluó la actividad de los siguientes sistemas durante la infección: a) Inhibición de síntesis

de proteínas mediante la fosforilación del factor eucarionte de inicio de la traducción eIF2 α y b) Degradación de RNAs ribosomales inducida por el complejo 2'5'-OAS/RNasa L.

Como resultado de diversos estímulos, se pueden activar cinasas que fosforilan al factor eucarionte de inicio de la traducción eIF2- α , lo cual resulta en la inhibición de la síntesis de proteínas (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). En células MA104 infectadas con rotavirus se inhibe severamente la síntesis de proteínas celulares, sin embargo la síntesis de proteínas virales no se afecta (Montero et al., 2008). Recientemente en nuestro laboratorio se describió que la proteína-cinasa R (PKR), la cual se activa en presencia de RNA de doble cadena, es la responsable de la fosforilación de eIF2 α durante la infección con rotavirus [Rojas et al., 2010], probablemente por el reconocimiento de material genético de rotavirus presente en el citoplasma celular o bien, por el reconocimiento de complejos de replicación de RNA de doble cadena, sin embargo no se ha demostrado la interacción directa de PKR con ninguno de estos blancos durante la infección.

Nuestros resultados indican que en la línea celular HUH 7.5.1, el factor eucarionte de inicio de la traducción (eIF2 α) no se fosforila durante la infección con rotavirus. La falta de fosforilación de eIF2 α podría explicarse debido a los bajos niveles de expresión de PKR, la cinasa que fosforila a este factor durante la infección con rotavirus, sin embargo, no se descarta algún otro factor que pudiera intervenir; como cambios en la estructura de la proteína eIF2- α producidos durante el proceso mediante el cual se hizo más permisiva esta línea celular [Zhong et al., 2005] o algún tipo de desregulación de esta vía en esta línea celular. Estos resultados sugieren que la regulación de la traducción durante la infección en células MA104 y HUH 7.5.1 podría ser diferente y que aún cuando eIF2 α no se fosforila y no se inhibe la síntesis de proteínas celulares, rotavirus se puede replicar de manera eficiente.

De manera interesante, durante la infección con HCV en la línea celular HUH 7.5.1 se detecta al factor eIF2 α en su estado fosforilado en niveles comparables a otras líneas celulares [Zhang et al., 2013]. En conjunto estos resultados sugieren que en la línea celular HUH 7.5.1, se puede inhibir la producción de síntesis de

proteínas por medio de la fosforilación de eIF2 α inducida por PERK, pero no por PKR. Se requieren futuros estudios para determinar la contribución de la vía de PKR durante la infección con rotavirus.

Finalmente, se evaluó la actividad del sistema 2',5'-OAS/RNasa L, no se detectó degradación de RNAs ribosomales en la línea celular HUH 7.5.1 al transfectarla con RNAdc, a diferencia de la línea celular MA104. Estos resultados indican que el sistema 2',5'-OAS/RNasa L no se encuentra activo en la línea celular HUH 7.5.1. Estos resultados se reportaron recientemente por otro grupo de investigación, en este trabajo se encontró que la línea celular HUH 7.5.1, al igual que las clonas HUH 7.5 y HUH 7 no expresan RNasa L, lo cual explica la falta de actividad de este sistema antiviral [Kwon et al., 2013].

IX. Conclusiones

1. Se encontró que la cepa UK es sensible a IFN tipo I, mientras que la cepa RRV es poco afectada por esta molécula antiviral en la línea celular MA104.
2. Los resultados sugieren que una de las proteínas de capa externa es la responsable del fenotipo de resistencia a IFN tipo I; ya que RRV es sensible en ausencia de las proteínas VP4 y VP7, con alrededor de 90% de disminución en la infectividad.
3. Empleando rearreglantes de los virus RRV y UK, se determinó que la proteína VP4 de la cepa RRV probablemente es la responsable del fenotipo de resistencia a IFN tipo I.
4. Se evaluó el efecto de IFN tipo I en las cepas Nar3, Nar14 y Nar18. Se encontró que las tres cepas son sensibles a IFN, lo cual sugiere que una de las mutaciones en común en los aminoácidos 37 (Leu a Pro) y/o 267 (Tyr a Cys) les podría conferir este fenotipo.
5. Se evaluó la infectividad de TLPs y DLPs en distintas líneas celulares y se identificó que la línea celular HUH 7.5.1 posee una alta permisividad en pasos posteriores a la entrada.
6. Se determinó que la síntesis de proteínas celulares no se inhibe en células HUH 7.5.1 durante la infección con rotavirus.
7. Se demostró que eIF2 α no se fosforila en células HUH 7.5.1 durante la infección, probablemente debido a los bajos niveles de expresión de PKR.
8. Se detectó que el sistema 2'5-OAS/RNasa L no se encuentra activo en la línea celular HUH 7.5.1. Este hallazgo se reportó recientemente por otro grupo [Kwon et al., 2013] y se describió que es debido a que esta línea celular no expresa RNasa L.

X. Perspectivas

1. Determinar si la resistencia a IFN tipo I mediada por VP4 de la cepa RRV es debido a la vía endocítica empleada durante el proceso de entrada a las células.
2. Estudiar los genes estimulados por IFN tipo I que inhiben la replicación de cepas sensibles a IFN como UK y YM.
3. Estudiar el efecto de otros tipos de IFN (II y III) en la restricción del ciclo infeccioso.
4. Determinar cuál(es) de los sistemas antivirales que se encuentran defectivos en la línea celular HUH 7.5.1 son los determinantes de la alta permisividad a rotavirus.
5. Estudiar la repercusión de la falta de inhibición de síntesis de proteínas celulares en la línea HUH 7.5.1 durante la infección con rotavirus.
6. Continuar con la caracterización de la actividad de otros mecanismos antivirales en la línea celular altamente permisiva HUH 7.5.1.

XI. Referencias

- Angel J, Franco MA, Greenberg HB. (2007) , Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:529–539.
- Arias, C. F., M. A. Dector, L. Segovia, T. Lopez, M. Camacho, P. Isa, R. Espinosa, and S. Lopez. (2004) RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Res.* 102;43-51.
- Arias, C.F., Guerrero, C.A., Mendez, E., Zarate, S., Isa, P., Espinosa, R., Romero, P., Lopez, S., (2001) Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s). *Novartis Found. Symp.* 238, 47–60, discussion 60–43.
- Arnold M. M., Patton J. T. (2011) Diversity of interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains. *J Virol* 85, 1970–1979. doi: 10.1128/JVI.01801-10.
- Ball, J. M., P. Tian, C. Q-Y. Zeng, A. P. Morris, and M. K. Estes. (1996) Age-dependent diarrhea induced by a rotavirus nonstructural glycoprotein. *Science* 272:101–104.
- Barro M, Patton JT. (2007) Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *J Virol* 81: 4473–81.
- Bartenschlager R, Pietschmann T. (2005) Efficient hepatitis C virus cell culture system: what a difference the host cell makes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:9739–40.
- Bass DM. (1997) Interferon gamma and interleukin 1, but not interferon alfa, inhibit rotavirus entry into human intestinal cell lines. *Gastroenterology* 113(1):81–89.
- Bass, D. M., M. R. Baylor, C. Chen, E. M. Mackow, M. Bremont, and H. B. Greenberg. (1992) Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J. Clin. Investig.* 90:2313-2320.
- Blutt SE, Fenaux M, Warfield KL, Greenberg HB, Conner ME. (2006) Active viremia in rotavirus-infected mice. *J Virol.* 80: 6702-5.
- Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG (2009) Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *Immunology letters* 122: 1–11.
- Bowie AG, Unterholzner L. (2008) Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 8:911–922.
- Bridger, J. C., G. I. Tauscher, and U. Desselberger. (1998) Viral determinants of rotavirus pathogenicity in pigs: evidence that the fourth gene of a porcine rotavirus confers diarrhea in the homologous host. *J Virol* 72:6929-31.

- Broquet, A. H., Y. Hirata, C. S. McAllister, and M. F. Kagnoff. (2011) RIGI/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus infected intestinal epithelium. *J. Immunol.* 186:1618–1626.
- Broome, R. L., P. T. Vo, R. L. Ward, H. F. Clark, and H. B. Greenberg. (1993) Murine rotavirus genes encoding outer capsid proteins VP4 and VP7 are not major determinants of host range restriction and virulence. *J Virol* 67:2448-55.
- Burke B, Desselberger U. (1996) Rotavirus pathogenicity. *Virology.* 218: 299-305.
- Ciarlet, M., M. K. Estes, C. Barone, R. F. Ramig, and M. E. Conner. (1998) Analysis of host range restriction determinants in the rabbit model: comparison of homologous and heterologous rotavirus infections. *J. Virol.* 72:2341-2351.
- Ciarlet M., Crawford S. E., Cheng E., Blutt S. E., Rice D. A., Bergelson J. M., Estes M. K. (2002) *J. Virol.* 76, 1109–1123.
- De Boissieu D, Lebon P, Badoual J, Bompard Y, Dupont C. (1993) Rotavirus induces alpha-interferon release in children with gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 16: 29–32.
- Díaz-Salinas MA, Romero P, Espinosa R, Hoshino Y, López S, Arias CF. (2013) The spike protein VP4 defines the endocytic pathway used by rotavirus to enter MA104 cells. *J Virol.* 87(3):1658-63.
- Dunn, S. J., T. L. Cross, and H. B. Greenberg. (1994) Comparison of the rotavirus nonstructural protein NSP1 (NS53) from different species by sequence analysis and Northern blot hybridization. *Virology* 203:178-183.
- Durbin RK, Kotenko SV, Durbin JE. (2013) Interferon induction and function at the mucosal surface. *Immunol Rev.* 255(1):25-39.
- Espejo, R. T., S. Lopez, and C. Arias. (1981) Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37:156–160.
- Estes, M. K., and A. Z. Kapikian. (2007) Rotaviruses, p. 1917–1974. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 5th ed., vol. 2, Philadelphia, PA.
- Estes, M.K. (2001) Rotaviruses and their replication. In: Knipe, D.N., Howley, P.M. (Eds.), *Virology*, fourth ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 1747–1785.
- Farrar MA, Schreiber RD. (1993) The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 11:571–611.
- Feng N, Kim B, Fenaux M, Nguyen H, Vo P, et al. (2008) Role of interferon in homologous and heterologous rotavirus infection in the intestines and extraintestinal organs of suckling mice. *J Virol* 82: 7578–7590.
- Feng N, Sen A, Nguyen H, Vo P, Hoshino Y, et al. (2009) Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblasts. *J Virol* 83: 6987–6994.

Feng, N., A. Sen, M. Wolf, P. Vo, Y. Hoshino, and H. B. Greenberg. (2011) Roles of VP4 and NSP1 in determining the distinctive replication capacities of simian rotavirus RRV and bovine rotavirus UK in the mouse biliary tract. *J Virol* 85:2686-94.

Feng N, Yasukawa LL, Sen A, Greenberg HB. (2013) Permissive Replication of Homologous Murine Rotavirus in the Mouse Intestine Is Primarily Regulated by VP4 and NSP1. *J Virol*. 2013 Aug;87(15):8307-16.

Frias AH, Jones RM, Fifadara NH, Vijay-Kumar M, Gewirtz AT. (2012) Rotavirus-induced IFN-beta promotes anti-viral signaling and apoptosis that modulate viral replication in intestinal epithelial cells. *Innate Immun* 18: 294–306.

Gantier, M. P., and B. R. Williams. (2007) The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18:363–371.

Graff JW, Ewen J, Ettayebi K, Hardy ME. (2009) Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. *J Gen Virol*. 88:613–620.

Graham, D. Y. and M. K. Estes. (1988) Viral infections of the intestine, p.566–578. In G. Gitnick (ed.), *Gastroenterology*. Medical Examination Publishing Company, New Hyde Park, N.Y.

Hartmann R, Justesen J, Sarkar SN, Sen GC, Yee VC. (2003) Crystal structure of the 2' -specific and double-stranded RNA-activated interferon-induced antiviral protein 2' -5' -oligoadenylate synthetase. *Mol Cell*. 12(5):1173-85.

Holloway G, Truong TT, Coulson BS. (2009) Rotavirus antagonizes cellular antiviral responses by inhibiting the nuclear accumulation of STAT1, STAT2, and NF-kappaB. *J Virol* 83: 4942–51.

Hoshino, Y., L. J. Saif, S. Y. Kang, M. M. Sereno, W. K. Chen, and A. Z. Kapikian. (1995) Identification of group A rotavirus genes associated with virulence of a porcine rotavirus and host range restriction of a human rotavirus in the gnotobiotic piglet model. *Virology* 209:274-80.

Hoshino, Y., R. W. Jones, R. M. Chanock, and A. Z. Kapikian. (2002) Generation and characterization of six single VP4 gene substitution reassortant rotavirus vaccine candidates: each bears a single human rotavirus VP4 gene encoding P serotype 1A[8] or 1B[4] and the remaining 10 genes of rhesus monkey rotavirus MMU18006 or bovine rotavirus UK. *Vaccine* 20:3576-3584.

Kim S, Oh DB, Kang HA, Kwon O. (2011) Features and applications of bacterial sialidases. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:1-15.

Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. (2003) IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4:69–77.

- Kwon YC, Kang JI, Hwang SB, Ahn BY. (2013) The ribonuclease L-dependent antiviral roles of human 2',5'-oligoadenylate synthetase family members against hepatitis C virus. *FEBS Lett* 587: 156–164.
- La Bonnardiere C, Cohen J, Contrepolis M (1981) Interferon activity in rotavirus infected newborn calves. *Ann Rech Vet* 12: 85–91.
- Liu K, Yang X, Wu Y, Li J. (2009) Rotavirus strategies to evade host antiviral innate immunity. *Immunol Lett.* 2;127(1):13-8.
- MacMicking JD. (2012) Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* 12: 367–382.
- Mendez E, Arias CF, Lopez S. (1993) Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* 67:5253–5259.
- Méndez, E., C. F. Arias, and S. López. (1996) Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J. Virol.* 70:1218-1222.
- Montero, H., M. Rojas, C. F. Arias, and S. Lopez. (2008) Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* 82:1496–1504.
- Novick D, Cohen B, Rubinstein M. (1994) The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 77:391–400.
- López S, Arias CF. (2004) Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 12:271–278.
- Offit, P. A., G. Blavat, H. B. Greenberg, and H. F. Clark. (1986) Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4. *J Virol.* 57:46-9.
- Parashar, U. D., E. G. Hummelman, J. S. Bresee, M. A. Miller, and R. I. Glass. (2003) Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9:565–572.
- Patton, J.T., Spencer, E., (2000) Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* 277, 217–225.
- Pestka S, Krause CD, Walter MR. (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202:8–32.
- Piron, M., P. Vende, J. Cohen, and D. Poncet. (1998) Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* 17:5811–5821.
- Platanias LC. (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* 5(5):375-86.

- Pott J, Mahlakoiv T, Mordstein M, Duerr CU, Michiels T, et al. (2011) IFN-lambda determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 7944–7949.
- Ramig RF. (2004) Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol*. 78:10213–10220.
- Rebouillat D, Hovanessian AG. (1999) The human 2', 5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res*. 19:295–308.
- Rojas M, Arias CF, López S. (2010) Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2alpha in rotavirus infection. *J Virol*. 84(20):10457-66.
- Rubinstein S, Familletti PC, Pestka S. (1981) Convenient assay for interferons. *J Virol*. 37:755–758.
- Ruíz AM, López IV, López S, Espejo RT, Arias CF. (1988) Molecular and antigenic characterization of porcine rotavirus YM, a possible new rotavirus serotype. *J Virol*. 62:4331– 4336.
- Sadler AJ, Williams BR. (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8:559–68.
- Samuel CE. (1993) The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeast to humans. *J Biol Chem*. 268:7603–7606.
- Sen A, Pruijssers AJ, Dermody TS, García-Sastre A, Greenberg HB. (2011) The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3. *J Virol*. 85(8):3717-32.
- Sen A, Rothenberg ME, Mukherjee G, Feng N, Kalisky T, Nair N, Johnstone IM, Clarke MF, Greenberg HB. (2012) Innate immune response to homologous rotavirus infection in the small intestinal villous epithelium at single-cell resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(50):20667–20672.
- Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, et al. (2011) A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472: 481–485.
- Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, et al. (2003) IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 4:63–8.
- Sumpter R Jr, Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, et al. (2005) Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 79: 2689–2699.
- Takeuchi O, Akira S. (2008) MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol*. 20:17–22.
- Wang Q., Carmichael G. G. (2004) Effects of length and location on the cellular response to double-stranded RNA. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:432–452.

Wang W, Donnelly B, Bondoc A, Mohanty SK, McNeal M et al. (2011) The rhesus rotavirus gene encoding VP4 is a major determinant in the pathogenesis of biliary atresia in newborn mice. *J Virol.* 2011 Sep;85(17):9069-77.

Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, et al. (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9294–9299.

Zhang L, Alter HJ, Wang H, Jia S, Wang E, Marincola FM, Shih JW, Wang RY. (2013) The modulation of hepatitis C virus 1a replication by PKR is dependent on NF- κ B mediated interferon beta response in Huh7.5.1 cells. *Virology.* 30;438(1):28-36.