



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN DE LAS INTERACCIONES TEMPRANAS DE
ASTROVIRUS DE HUMANO CON CÉLULAS PERMISIVAS Y RESISTENTES A
LA INFECCIÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
NAYELI AGUILAR HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Carlos F. Arias Ortiz (IBT-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz (IBT-UNAM)
Dr. Edmundo Castillo Rosales (IBT-UNAM)

Cuernavaca, Morelos. Febrero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO

Presidente Dr. Alejandro Alagón Cano

Secretario Dr. Ramón González García-Conde

Vocal Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Vocal Dr. Juan Ernesto Ludert León

Vocal Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología Molecular, del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del Dr. Carlos F. Arias Ortiz. En la realización de la presente se contó con el apoyo de la beca CONACYT.

*A María Elena Fuentes Martínez y
Jesús Hernández Fuentes*

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Generalidades de los astrovirus.....	3
Astrovirus de humano.....	4
Estructura y organización del genoma viral.....	7
Genoma de astrovirus.....	7
Ciclo de replicación.....	9
Unión y entrada.....	9
Traducción y replicación.....	10
Síntesis de proteínas estructurales, ensamble y salida del virión.....	13
Estructura del virus.....	14
El dominio de espícula interactúa con anticuerpos monoclonales neutralizantes y probablemente con el receptor celular.....	17
Proteínas de uniones estrechas.....	19
Papel de las uniones estrechas en la interacción virus-célula.....	20
ANTECEDENTES.....	22
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO.....	25
OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
METODOLOGÍA.....	26
Células y virus.....	26
Anticuerpos y reactivos.....	26
Purificación de partículas virales.....	27
Tratamiento con tripsina para remover VP25.....	27
Western blot.....	28
Ensayos de infectividad.....	28
Determinación de la progenie viral.....	29
Marcaje radioactivo de partículas virales.....	29
Ensayo de unión.....	29
Far western.....	30

Identificación de proteínas por espectrometría de masas	30
Análisis estadístico	31
RESULTADOS	32
OBJETIVO 1: Determinar la infectividad de los serotipos 1, 2 y 8 de HAstV en células con diferente permisividad (Caco-2, MA104, Vero y MDCK II).....	32
OBJETIVO 2: Determinar la unión de los tres virus a la superficie de células permisivas (Caco-2, MA104 y Vero) y no permisivas (MDCK II).	33
OBJETIVO 3: Determinar la producción de progenie viral de HAstV serotipos 1, 2 y 8 en células con diferente permisividad (Caco-2, MA104 y Vero).....	36
OBJETIVO 4: Caracterizar la posible diversidad de receptores para HAstV-1, HAstV-2 y HAstV-8 en células permisivas (Caco-2, MA104 y Vero).	38
OBJETIVO 5: Determinar el papel de JAM A en la infectividad de los tres serotipos de HAstV....	42
OBJETIVO 6: Definir la composición mínima de las proteínas que componen las partículas infecciosas de HAstV.	43
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS	55
REFERENCIAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Filograma de la familia <i>Astroviridae</i>	4
Figura 2. Prevalencia de los serotipos de astrovirus humanos en niños con diarrea.....	5
Figura 3. Reportes de astrovirus causantes de afecciones en el sistema nervioso central (SNC).....	6
Figura 4 Organización del genoma de astrovirus humanos.....	8
Figura 5. Replicación de astrovirus HAstV.....	12
Figura 6. Características de las proteínas estructurales de astrovirus..	14
Figura 7. Estructuras de los viriones y de las proteínas de cápside de HAstV.....	16
Figura 8. Modelo cristalográfico del virión maduro de HAstV-2 unido al Fab del anticuerpo neutralizante PL-2.....	18
Figura 9. Propuesta de los dominios funcionales de las proteínas de la cápside de astrovirus.....	18
Figura 10. Uniones estrechas y replicación viral.....	21
Figura 11. Infectividad de astrovirus serotipos 1, 2 y 8 en diferentes líneas celulares.....	33
Figura 12. Unión de los diferentes serotipos de HAstV a células permisivas y no permisivas.....	35
Figura 13. Determinación del rendimiento viral de HAstV-1, HAstV-2 y HAstV-8 en células permisivas y parcialmente permisivas a la infección.....	37
Figura 14. Ensayo de <i>far western</i>	40
Figura 15 infectividad de HAstV-1, HAstV-2 y HAstV-8 en células SKCO-15 (JAM-A +) y S1A2 (JAM-A -).....	43
Figura 16. Seguimiento de las proteínas estructurales de HAstV-8 durante la purificación.....	45
Figura 17. Seguimiento de las proteínas estructurales de HAstV-8 después de la segunda digestión con tripsina.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Replicación de serotipos de astrovirus en múltiples líneas celulares.....	23
Tabla 2. Transfección en células BHK y Caco-2 con RNA aislado de células Caco-2 infectadas con HAstV-1 y título del virus infeccioso recuperado.....	24
Tabla 3. Partículas virales de HAstV infecciosas producidas por célula infectada en diferentes células permisivas.....	38
Tabla 4. Proteínas de membrana identificadas por espectrometría de masas.....	41
Tabla 5. Proteínas identificadas por espectrometría de masas previamente reportadas como receptores virales.....	42
Tabla 6. Determinación del título viral en cada paso de la purificación de partículas virales de HAstV-8.....	47

RESUMEN

Los astrovirus se han posicionado como uno de los principales agentes causantes de gastroenteritis virales en niños y adultos mayores, a nivel mundial. Actualmente se han reportado ocho serotipos clásicos y dos serotipos nuevos (que tienen una mayor identidad genética con astrovirus aislados de animales) de astrovirus de humano (HAstV). Los HAstV son partículas icosaédricas de aproximadamente 44 nm de diámetro y, en su forma infecciosa, presentan 30 espículas formadas por dímeros de las proteínas VP25/VP27. Se ha demostrado que estas espículas son las que reconocen al receptor celular. En el presente trabajo se caracterizaron las interacciones tempranas que ocurren entre tres de los serotipos de HAstV detectados con mayor frecuencia (1, 2 y 8) y la célula hospedera. Para ello se realizaron ensayos de infectividad en cuatro líneas celulares con distinto grado de permisividad: Caco-2, MA104, Vero y MDCK II. Se observó una diferencia en el tropismo celular, resultando ser Caco-2 de 100 a 1000 veces más permisiva a la infección con HAstV que las líneas Vero y MA104, mientras que MDCK II resultó refractaria a la infección. Para elucidar la etapa o etapas del ciclo de infección que determinan las diferencias de replicación en las diferentes líneas celulares, se realizaron ensayos en los que se cuantificó el número de partículas virales que se producen en cada tipo de célula y la capacidad de los virus para unirse a la superficie de las mismas. Se encontró que los tres serotipos se unen a células Caco-2 con mayor eficiencia que a las otras líneas celulares evaluadas, y también se observó que se producen más partículas virales/célula en células Caco-2 que en células MA104 y Vero infectadas, lo que indica que la restricción a la infección se encuentra a varios niveles del ciclo viral. Interesantemente, a pesar de que la línea celular MDCK II resultó no ser permisiva para la replicación de HAstV, los diferentes serotipos fueron capaces de unirse a ella, lo que indica la existencia de receptores virales en su superficie y que su falta de permisividad está en un paso posterior a la unión. Por otra parte, aprovechando que las proteínas que componen a las espículas virales pueden producirse en gran cantidad en bacterias, manteniendo la estructura que tienen en la partícula viral, llevamos a cabo ensayos de *Far Western*, que consisten en separar las proteínas de membrana de las diferentes líneas celulares por electroforesis en geles de poliacrilamida, transferirlas a una membrana de nitrocelulosa e incubar estas membranas con las espículas recombinantes, cuya unión a proteínas específicas en la membrana se revela con anticuerpos específicos. Mediante este tipo de ensayos se identificaron como posibles receptores para los serotipos 1 y 8 de HAstV a dos proteínas entre 65 y 75 kDa. El análisis por espectrometría de masas de las proteínas que migran en esta región del gel, identificó 23 proteínas de

membrana celular. Alguna de estas proteínas podría representar el receptor para HAstV, aunque se requieren más estudios para comprobarlo. Por otro lado, utilizando células deficientes en la proteína de uniones estrechas JAM-A, observamos que esta proteína restringe la infección de astrovirus hasta 10 veces en comparación con las mismas células que sí la tienen, indicando un novedoso papel supresor que pudiera estar relacionado con un posible requerimiento del virus para interactuar con alguna otra proteína de uniones estrechas o de la cara basolateral de la células que pudiera servir como receptor o co-receptor celular. Por otro lado, analizamos las proteínas virales que están presentes en las partículas infecciosas. Se ha reportado que la cápside de astrovirus está conformada por 3 proteínas, la proteína del core o VP34 y las proteínas VP25 y VP27 que, como se mencionó, conforman las espículas virales. Sin embargo, las predicciones basadas en la estructura cristalográfica de las proteínas de cápside del virus, han sugerido que VP25 no permanece unida al virión maduro. En este trabajo realizamos un seguimiento de las proteínas de cápside durante la purificación de partículas virales, observando la pérdida de VP25 en los pasos subsecuentes a la digestión con tripsina. Mediante tratamiento exhaustivo con esta enzima logramos obtener virus libre de VP25, sin que éste perdiera su capacidad infecciosa, indicando que esta proteína no es importante para la infectividad del virus. Los datos obtenidos en este trabajo contribuyen al estudio de las primeras interacciones virus-célula y al entendimiento del tropismo de cepas de astrovirus causantes de gastroenteritis en humanos.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de los astrovirus

Los astrovirus pertenecen a la familia *Astroviridae*, la cual incluye virus aislados de humanos y de animales. El nombre proviene de la palabra griega “*astron*”, que significa estrella, debido a su apariencia al microscopio electrónico. Estos virus tienen una simetría icosaédrica, con aproximadamente 41 nm de diámetro, no poseen una envoltura lipídica, y su genoma está formado por RNA de cadena sencilla de polaridad positiva (+) (Méndez y Arias, 2013).

La familia *Astroviridae* comprende los géneros *Mamastrovirus* y *Avastrovirus* (Figura 1). Las especies pertenecientes a estos géneros están presentes en una amplia variedad de hospederos incluyendo humanos, además de animales domésticos y silvestres. Dentro del género *Avastrovirus* se encuentran los astrovirus que infectan aves, como los de pato, de pavo (serotipos 1 y 2) y el virus de la nefritis aviar de pollos (serotipos 1 y 2). Los miembros de este género provocan una amplia variedad de enfermedades, como enteritis, hepatitis y nefritis, entre otras, causando pérdidas económicas en el sector avícola (Walter y col., 2003). El género *Mamastrovirus* incluye a los astrovirus aislados de humanos (HAstV) y de otros mamíferos animales como gatos, ovejas, perros, cerdos, ratones y visones (Méndez y Arias, 2013). Estos virus están asociados principalmente a gastroenteritis.

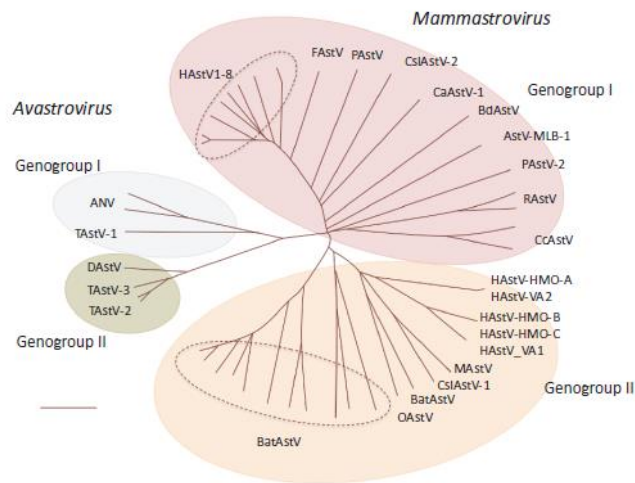


Figura 1. Filograma de la familia *Astroviridae*. La familia *Astroviridae* presenta dos géneros, *Avastrovirus* y *Mamastrovirus*. La clasificación de la especies de astrovirus está basada en la la secuencia de aminoácidos en el ORF2. (Tomado de Méndez y Arias, 2013)

Astrovirus de humano

Los astrovirus aislados de humanos (HAstV) fueron descubiertos en 1975 en muestras de heces de niños que cursaban con diarrea; desde entonces se ha reconocido el papel de HAstV como agente causante de gastroenteritis a nivel mundial. Los astrovirus son transmitidos primariamente a través de la vía fecal-oral; la población más comúnmente afectada son niños, principalmente en los primeros dos años de vida. Sin embargo, esta infección no afecta exclusivamente a infantes; algunos estudios han asociado a astrovirus con diarrea en personas de edad avanzada, pacientes inmunocomprometidos, pacientes adultos con enterocolitis necrotizante, niños prematuros, e incluso en pacientes adultos sanos (Méndez y col., 2013, Bosch y col., 2014). La distribución de las infecciones por astrovirus varía dependiendo de diversos factores, como el entorno clínico, la localización geográfica y la edad de la población analizada (Jeong y col., 2012).

Se han descrito ocho serotipos clásicos o canónicos circulando en la población humana. En general, como se muestra en la Figura 2, el HAstV serotipo 1 es aislado con mayor frecuencia a nivel mundial, sin embargo, esto puede variar de acuerdo a la localización geográfica de la población analizada. Por ejemplo, en Corea, China y Japón, el serotipo 1 se ha encontrado hasta en el 70% de las

infecciones por astrovirus, mientras que en Tailandia, la frecuencia relativa de este serotipo alcanzó sólo el 28% de los casos (Jeong y col., 2012). En países como México, el serotipo más encontrado en los dos estudios llevados a cabo a la fecha, ha sido el 2, aislándose en el 35% de las muestras de infecciones por astrovirus, seguido del serotipo 1 con el 23-25% (Guerrero y col. 1998, Méndez-Toss y col., 2004).

El serotipo 8 ha sido el último en describirse, sin embargo ya se ha reportado como un serotipo frecuente en países como Malawi, Egipto, Francia, España y México (Guix y col., 2002, Cunliffe y col., 2002, Chikhi-Brachet y col., 2002, Méndez-Toss y col., 2004). La identificación de HAstV como agente etiológico importante de enfermedades gastrointestinales se debe, en parte, al avance en la sensibilidad de las técnicas diagnósticas empleadas (Walter y col., 2003).

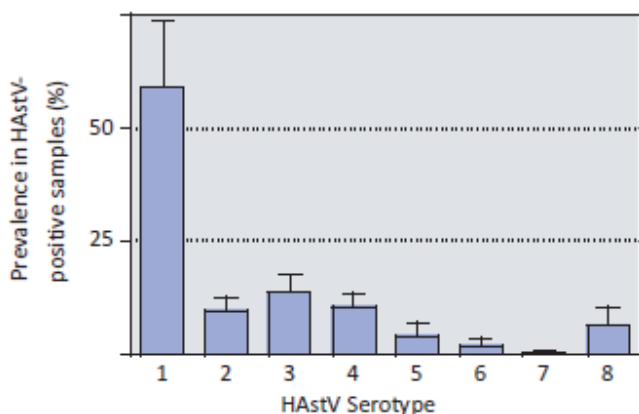


Figura 2. Prevalencia de los serotipos de astrovirus humanos en niños con diarrea. Esta gráfica compila los datos de seis estudios en diferentes países con 461 muestras positivas para astrovirus. (Tomado de Méndez y Arias, 2013).

En 2008, se descubrieron dos nuevos grupos de astrovirus cuya estructura y genoma difiere de los ocho serotipos clásicos, llamados MLB (Melbourne) y VA/HMO (del inglés “*Virginia/Human-Mink-Ovine-Like*”) (Vu y col., 2017). En humanos, estos virus se han encontrado en heces de individuos con diarrea, aunque la asociación como agente causante de la enfermedad aún no está clara.

Recientemente los serotipos clásicos, pero especialmente los “nuevos” astrovirus de humanos, han sido identificados como la causa de infecciones en el sistema nervioso central (SNC) en individuos inmunodeficientes (Figura 3), lo cual sugiere que los HAstV podrían pasar del tracto gastrointestinal a otros tejidos y órganos (Quan y col., 2010, Walter y col., 2003, Vu y col., 2016, Vu y col., 2017).

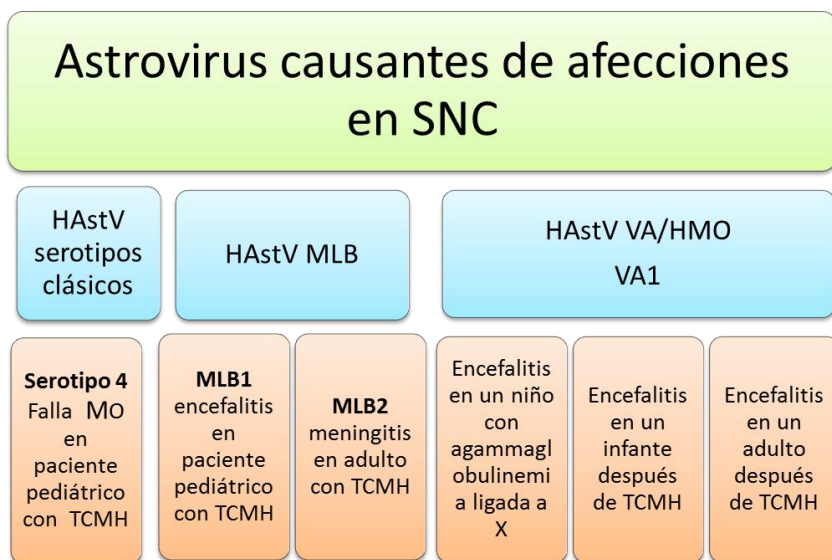


Figura 3. Reportes de astrovirus causantes de afecciones en el sistema nervioso central (SNC). MO: multiorgánica, TCMH: trasplante de células madre hematopoyéticas (Modificado de Vu y col., 2016).

Estructura y organización del genoma viral

Genoma de astrovirus

Los astrovirus poseen un genoma de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva, el cual varía en longitud entre cepas y serotipos desde 6.17 Kb para los HAstV hasta 7.72 Kb para astrovirus de pato (sin contar el extremo poli A en la región 3' no traducida). El genoma contiene regiones no traducidas (UTR, del inglés *untranslated region*) en los extremos 5' y 3' y tres marcos de lectura abierta (ORFs, del inglés *open reading frame*): ORF1a, ORF1b y ORF2 (Figura 4). Los dos ORFs localizados hacia el extremo 5' del genoma se denominan ORF1a y ORF1b y se pueden traducir juntos mediante un cambio de marco de lectura ("*frameshift*"); ambos marcos codifican para las proteínas no estructurales, involucradas en el ciclo de replicación del virus. El ORF1a codifica para la poliproteína NSP1a, que produce una serina proteasa y la proteína VPg, la cual se piensa que juega un papel importante en el reclutamiento de la maquinaria de traducción (Fuentes y col., 2012); además, mediante el análisis de su secuencia se ha predicho que NSP1a da lugar a una helicasa y a polipéptidos con varios dominios transmembranales, aunque su función no está caracterizada. El ORF1b codifica para la RNA polimerasa viral dependiente de RNA (RdRp) (Jolan 2012, Méndez y col., 2013).

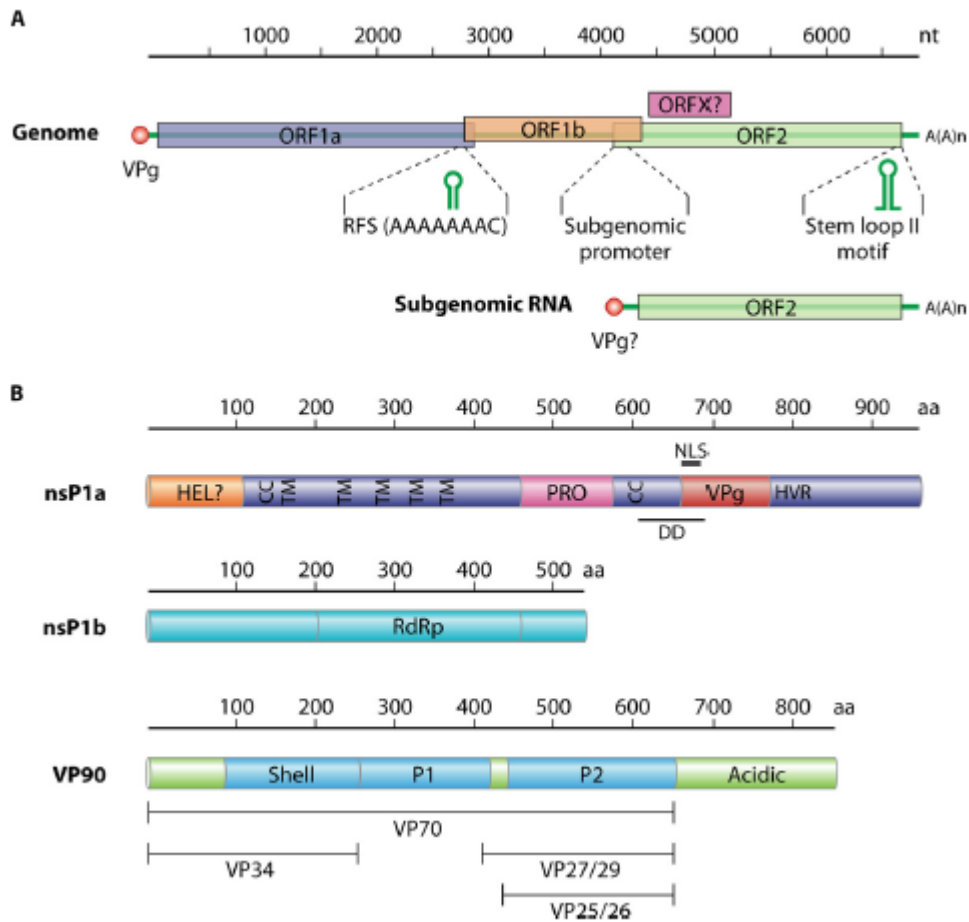


Figura 4 Organización del genoma de astrovirus humanos. a) Organización del RNA genómico y subgenómico, indicando los marcos de lectura abierta (ORFs) ORF1a, ORF1b, ORF2 y el putativo ORFX. b) Posibles motivos de las poliproteínas no estructurales y estructurales de astrovirus. La poliproteína estructural VP90, codificada por el ORF2, consiste en regiones conservadas (P1 y cápside o “Shell”), una región variable que codifica para el dominio P2 (espículas), y una región C-terminal que es procesada por caspasas celulares dando como producto el precursor VP70. Las partículas que contienen VP70 son posteriormente procesadas por tripsina produciendo las proteínas VP34, VP27 y VP25. HEL, dominio putativo de helicasa; VPg, región codificante para la proteína VPg; HVR, región hipervariable; NLS señal de localización nuclear putativa; DD, dominio de muerte putativo; RdRp, RNA polimerasa dependiente de RNA (Tomado de Bosch, 2014).

Ciclo de replicación

Unión y entrada

Los HAstV requieren ser procesados por tripsina para aumentar su infectividad. Estudios hechos en células Caco-2 con HAstV serotipo 8 mostraron que el tiempo medio de unión del virus a la superficie celular es de 10 min (Méndez y col., 2014). Al analizar la estructura cristalográfica de las espículas que se proyectan de la superficie del virus, se observó que ésta presenta residuos conservados que revelan un sitio putativo de unión a receptor, con una composición de aminoácidos característica de reconocimiento a polisacáridos, por lo que se ha sugerido que el receptor pudiera ser un glicano (Dong y col., 2011). Sin embargo, se ha probado sin éxito la capacidad de algunos polisacáridos (heparina, heparán sulfato y dextrán sulfato) para bloquear la infectividad de HAstV-8, observándose sólo un bloqueo parcial en su infectividad (Dong y col., 2011).

La cepa Yuc8 de HAstV se internaliza a través de la vía endocítica mediada por clatrina. Esto se determinó mediante el uso de inhibidores específicos de la vía (Méndez y col., 2014), y también mediante la tecnología de RNAi (RNA de interferencia) al reducir la expresión de la cadena pesada de clatrina, y mediante ensayos con dominantes negativas de las proteínas dinamina 2 (GTPasa que participa en la escisión de los endosomas de la membrana celular) y Eps 15 (proteína adaptadora durante la endocitosis mediada por clatrina). En todos los casos se observó una reducción en la infectividad de HAstV 8. Además de esto, se reportó que Yuc8 requiere de la polimerización de actina para entrar a la célula (Méndez y col., 2014).

Por otro lado, se determinó que la reducción por RNAi de la síntesis de la proteína Rab7, una GTPasa pequeña involucrada en la maduración de los endosomas, reduce la infectividad del virus en un 50%, lo cual sugiere que el virus tiene que llegar hasta endosomas tardíos (Méndez y col., 2014). Una vez que el endosoma se acidifica puede darse la permeabilización de la membrana y con ello el RNA puede liberarse hacia el citoplasma; el tiempo estimado para que esto suceda es de alrededor de 130 minutos (Méndez y col., 2014).

Traducción y replicación

Una vez en el citoplasma, el RNA genómico se traduce directamente para dar lugar a las poliproteínas no estructurales nsp1a y nsp1ab. La poliproteína nsp1a está codificada en el ORF1a y la poliproteína nsp1ab se sintetiza como fusión de los mRNAs codificados en los ORFs 1a y 1b. Esto se produce a través de un cambio de fase de lectura -1 (*frameshift*), utilizando la señal de cambio presente entre estos dos ORFs, la cual consiste en una secuencia heptamérica (AAAAAAC) y una estructura río abajo de “*stem-loop*”, las cuales están conservadas entre todos los astrovirus conocidos (Brierley y Vidakovic, 2003).

Las poliproteínas nsp1a y nsp1b, se procesan proteolíticamente por una proteasa viral, así como por al menos una proteasa celular, dando lugar a las proteínas no estructurales del virus (Méndez y col., 2003). Dentro de los productos finales del corte proteolítico identificados hasta ahora, se encuentran, en nsp1a, la proteasa viral, una posible helicasa y la proteína VPg, la cual está unida covalentemente al extremo 5' del genoma viral y es necesaria para su traducción y quizá para la replicación del RNA viral (Fuentes y col., 2012). A su vez, el ORF1b codifica para la RNA polimerasa del virus, que es dependiente de RNA. El ORF2 codifica para la poliproteína VP90 precursora de la cápside viral, a partir de un RNA subgenómico, la cual es procesada intracelularmente por caspasas y extracelularmente por tripsina, para dar lugar a las proteínas finales de cápside presentes en el virus infeccioso, VP34, VP27 y VP25 (Méndez y col., 2002). Aunque recientemente hemos encontrado que los viriones maduros están únicamente compuestos por dos polipéptidos: VP34 y VP27 (ver más adelante).

La replicación del genoma viral no ha sido bien caracterizada, pero se piensa que es similar a la empleada por otros virus de RNA de polaridad positiva. Esto es, a partir del RNA genómico de polaridad positiva (+) se sintetiza inicialmente la cadena de RNA negativa (también llamado RNA antígenómico); este RNA de polaridad negativa (-) se utiliza como molde para la producción de más moléculas de RNA genómico (gRNA) y también para la síntesis del RNA subgenómico (sgRNA) para la expresión de las proteínas de cápside, ambos de polaridad

positiva. La participación de proteínas celulares en este proceso y los mecanismos usados por el virus para coordinar los procesos de replicación, transcripción y traducción aún no se han elucidado, sin embargo se piensa que este proceso se lleva a cabo en compartimientos asociados a membranas celulares (Méndez y col., 2007).

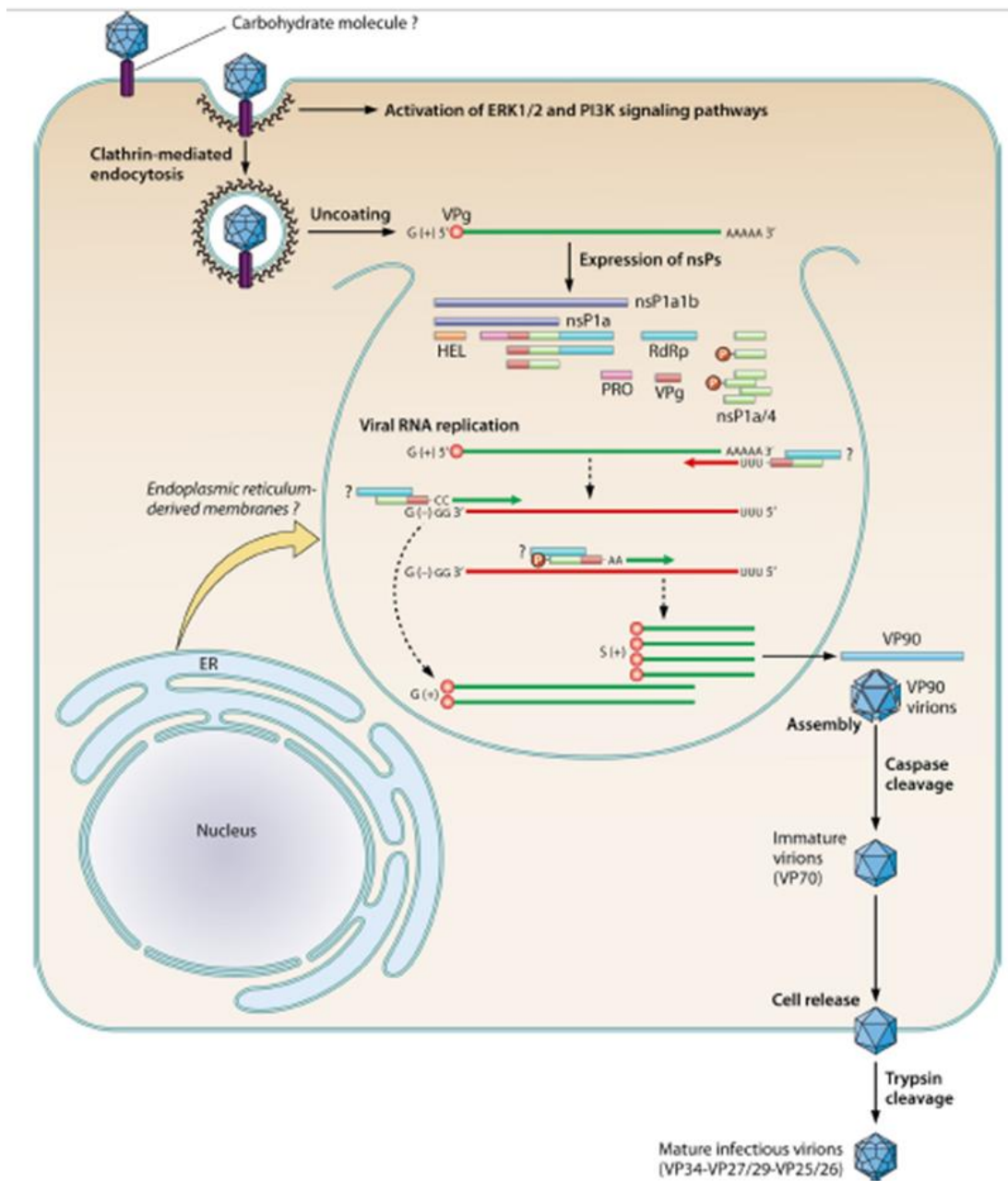


Figura 5. Replicación de HAdV. Después de la unión al receptor celular y posibles correceptores, el virus entra a la célula por medio de endocitosis mediada por clatrina. Un descenso en el pH permite el desnudamiento viral. Las proteínas no estructurales son traducidas a partir del RNA genómico ligado a una VPg y posteriormente éstas se cortan por una proteasa viral y por proteasas celulares, resultando en las proteínas no estructurales maduras, las cuales son necesarias para la replicación del genoma. Los complejos de replicación se ensamblan en asociación con membranas intracelulares y allí es donde se produce el RNA de polaridad negativa a partir del cual se producirá más RNA genómico y el RNA subgenómico para la expresión de las proteínas de cápside. Los virus inmaduros se ensamblan con la poliproteína estructural VP90. Por la acción de caspasas la poliproteína se digiere, para dar lugar a cápsides inmaduras con la poliproteína VP70. La liberación de las partículas virales parece ocurrir sin lisis celular, una vez fuera, los viriones maduran extracelularmente por la acción de tripsina (Tomado de Bosch y col., 2014).

Síntesis de proteínas estructurales, ensamble y salida del virión.

El ORF2 está codificado en el sgRNA, el cual dirige la síntesis de la poliproteína estructural VP90; la traducción de este RNA probablemente depende también del reclutamiento de la maquinaria de traducción mediado por la proteína VPg (Fuentes y col., 2012). La poliproteína estructural posee la mayor variabilidad entre las diferentes especies de astrovirus en relación a las proteínas no estructurales; su longitud varía de 672 a 850 aminoácidos (Méndez y Arias, 2013).

VP90 consta de una región conservada (el dominio de la cápside), de una región variable (dominio del *spike*) que da lugar a las espículas y de una región ácida en el carboxilo terminal (Figura 6). Para que el virión pueda salir de la célula es necesario que VP90 se procese proteolíticamente en el extremo carboxilo terminal mediante varios cortes por caspasas celulares, resultando en una proteína de cápside de 70 kDa, denominada VP70 (Méndez y col., 2002). Ésta, a su vez, requiere procesarse por tripsina en el medio exterior para aumentar la infectividad del virus, resultando finalmente en las proteínas VP34, VP25 y VP27. Estas dos últimas forman las espículas del virus mientras que VP34 constituye la cápside o core viral (Figura 6). La longitud de estos tres polipéptidos puede variar de acuerdo a la cepa de astrovirus (Bass y col., 2000).

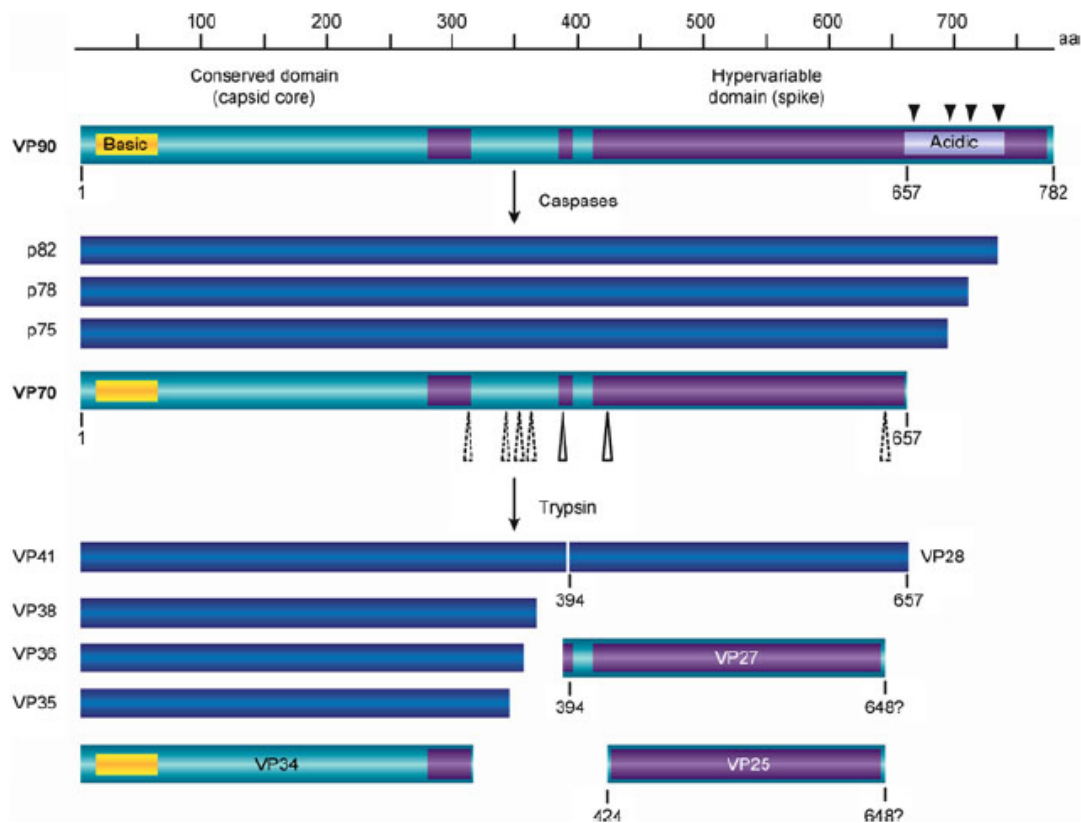


Figura 6. Características de las proteínas estructurales de astrovirus. El producto inicial del ORF2 (llamado VP90) contiene dos dominios que se distinguen por su grado de conservación: el dominio N-terminal está altamente conservado y da lugar a la cápside, mientras que el dominio C-terminal es hipervariable y forma las espículas de la partícula viral. VP90 es procesado en su carboxilo terminal por caspasas generando VP70 (se muestran en azul los productos intermedios), la proteína presente en los viriones extracelulares. Estas partículas se procesan a su vez por tripsina para generar intermedios de tamaño variable (en azul) y los productos finales VP34, VP27 y VP25. Las flechas negras pequeñas representan los cortes mediados por caspasas celulares; las flechas grandes sin relleno representan los cortes por tripsina (Tomado de Méndez, 2013).

Estructura del virus

En la última década se ha estudiado la estructura de HAstV por crío-microscopía electrónica y también se ha elucidado la estructura de las proteínas de la cápside por cristalografía de alta resolución (Bass y Qiu, 2000; Méndez y col., 2002, Dong y col., 2011; Dryden y col., 2012).

Las estructuras de los viriones inmaduros (formados por la poliproteína VP70) y maduros (formados por los polipéptidos VP34, 27 y 25) se ha determinado a una resolución de 25 Å por criomicroscopía electrónica (Figura 7) (Bass y Qiu, 2000; Méndez y col., 2002); así mismo, esta técnica ha permitido determinar que el

dominio del core de HAstV forma una estructura icosaédrica de simetría T=3, y que éste se divide a su vez en dos subdominios: el core interno (*inner core*) y el core externo (*outer core*). Las partículas inmaduras muestran 90 espículas, mientras que en partículas maduras sólo se presentan 30 (Figura 7), por lo que se presume que al desprenderse algunas de las espículas del virión inmaduro se expongan sitios de reconocimiento al receptor celular, provocando que la partícula de HAstV sea infecciosa (Bass y Qiu, 2000; Méndez y col., 2002).

El análisis cristalográfico de las proteínas de cápside de astrovirus ha permitido describir a detalle las estructuras del core y la espícula a 2.15 y a 1.8 Å, respectivamente. El core interno de los viriones maduros e inmaduros es prácticamente idéntico, mide aproximadamente 35 nm de diámetro y está constituido por un barril de láminas β en forma de remolino o "*jelly roll*". El core externo (*outer core*) está conformado por un barril de láminas β plegadas y, a diferencia del core interno, presenta diferencias considerables entre viriones maduros e inmaduros. Al ser digerido por tripsina, el core externo puede sufrir varios cortes, sin embargo, los fragmentos proteolíticos resultantes permanecen unidos al barril β (Toh y col., 2016).

El dominio de la espícula se presenta en dos formas, VP25 o VP27, llamadas así por sus pesos moleculares (25 y 27 kDa, respectivamente) y está localizado en la periferia de la partícula viral en forma de dímeros. Cada monómero está formado por una estructura de tres capas de láminas β colocadas en forma de sándwich. Al mapear las secuencias de los residuos de VP27 y VP25 se observó, interesantemente, que VP27 permanece unida a una lámina β del dominio del core, mientras que VP25 pareciera permanecer unida al core de manera débil, por lo que al realizar la digestión con tripsina es probable que ésta última se libere o que permanezca unida muy débilmente al virión (Dong y col., 2011; Dryden y col., 2012; York et al., 2015; Toh y col., 2016; Arias y Dubois, 2017).

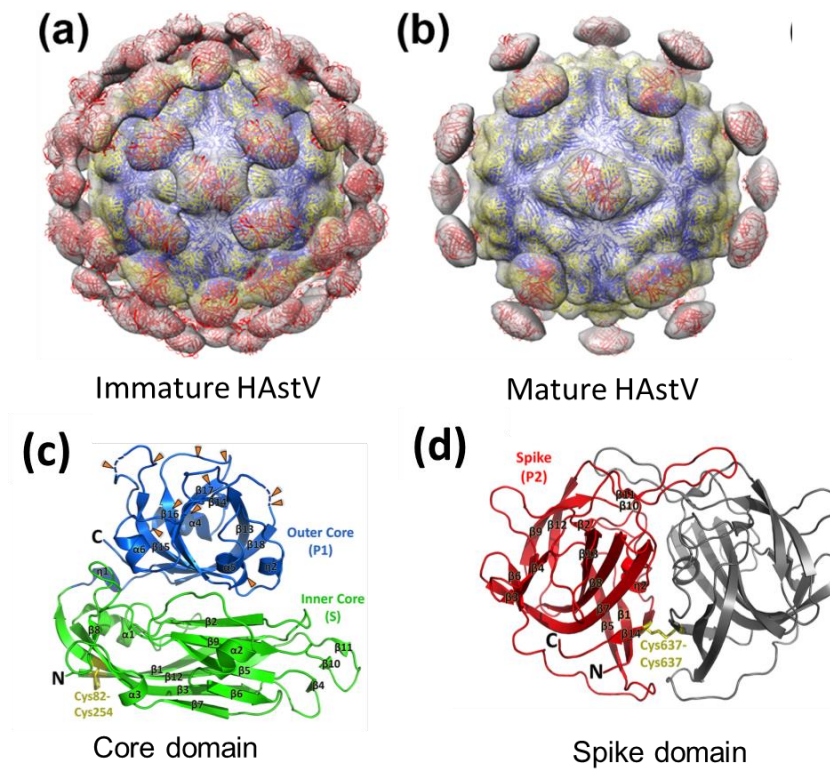


Figura 7. Estructuras de los viriones y de las proteínas de la cápside de HAstV. A) modelo del virión inmaduro de HAstV obtenido por crío-microscopía electrónica; B) modelo del virión maduro (digerido con tripsina) obtenido por crío-microscopía electrónica; C) estructura cristalográfica del dominio del core; en azul el core interno y en amarillo el core externo; D) estructura cristalográfica de la espícula en forma dimérica. (Tomado de Arias y Dubois, 2017)

El dominio de espícula interacciona con anticuerpos monoclonales neutralizantes y probablemente con el receptor celular.

En dos estudios previos se ha reportado la producción de anticuerpos monoclonales neutralizantes (AcM-Nt) contra HAstV. En el primero, Bass y colaboradores (1997) produjeron tres AcM-Nt a partir de ratones inmunizados con el HAstV serotipo 1. Uno de ellos (5B7) neutralizó sólo al serotipo 1, otro (7C2) neutralizó a los siete serotipos evaluados, mientras que el tercero (3B2) neutralizó sólo a los serotipos 1 y 7. Mediante ensayos de inmunoprecipitación identificaron que la proteína que interacciona con los AcM-Nt es la espícula del virus, el cual representa la región hipervariable del ORF2. Esto explica la neutralización diferencial de serotipos y demuestra la importancia de las espículas en la infección.

En el segundo estudio, el grupo de Sánchez-Fauquier y col. (1994) produjeron un AcM-Nt (PL-2) capaz de neutralizar la infección por HAstV-2. También mediante ensayos de inmunoprecipitación determinaron que la región de la cápside viral a la que se une dicho anticuerpo es la que conforma a las espículas virales. Recientemente, Bogdanoff y col. (2017) determinaron la estructura cristalográfica de la espícula de HAstV-2 en complejo con el AcM-Nt PL-2, corroborando la observación de Sánchez-Fauquier, de la interacción del sitio de unión del AcM en la espícula viral. Además de esto, el grupo de Rebecca Dubois en la Universidad de California, Santa Cruz, determinó que el AcM PL-2 neutraliza la infectividad del virus al impedir la interacción entre la espícula y la célula hospedera, proveyendo evidencia de que la espícula es la proteína viral encargada del reconocimiento del receptor celular (Figura 8). Esto ya se había sugerido en 2005 por el grupo de Krishna (Krishna, 2005), mediante predicciones basadas en la secuencia de las proteínas de la cápside de los ocho serotipos de HAstV y de algunos astrovirus de animales (Figura 9).

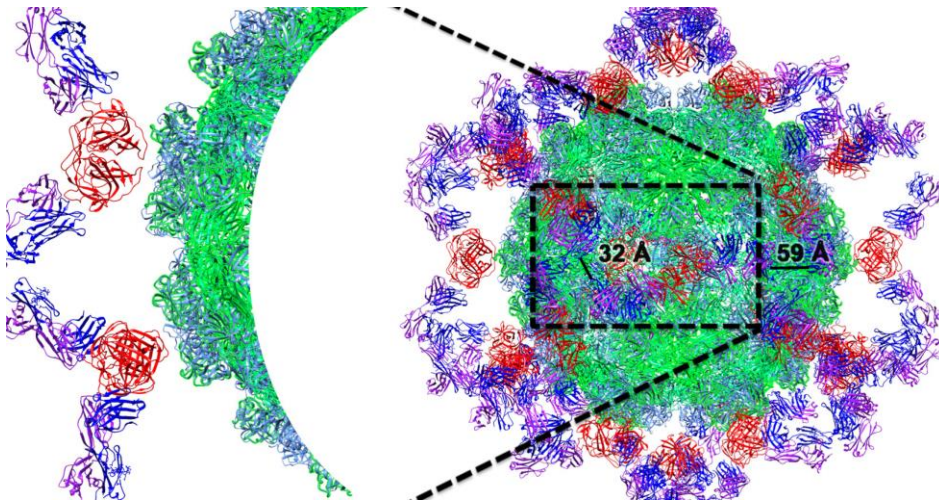


Figura 8. Modelo cristalográfico del virión maduro de HAstV-2 unido al Fab del anticuerpo neutralizante PL-2. Se muestran en color los dominios estructurales. El core interno (verde), el dominio del core externo (azul claro), el dominio de la espícula (rojo), la cadena ligera del Fab PL-2 (morado), la cadena pesada del Fab PL-2 (azul). (Tomado de Bogdanoff y col., 2017).

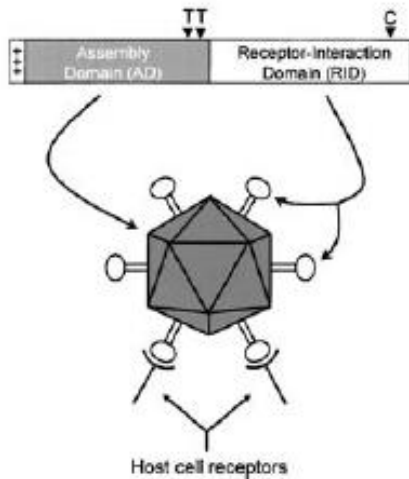


Figura 9. Propuesta de los dominios funcionales de las proteínas de la cápside de astrovirus. Se ilustran las proteínas de cápside con las regiones conservadas (gris) e hipervariables (blanco). Se propone que el dominio N-terminal cargado positivamente (indicado +++) participa en el empaquetamiento del RNA viral; con flechas se indican los sitios de corte con tripsina (T) o caspasas (C). Con base en la comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína estructural de diferentes HAstV, se propuso que la región conservada de las proteínas de la cápside codifican para el dominio de ensamble (AD), requerido para el encapsidamiento del RNA viral, mientras que la región variable corresponde al dominio de interacción con el receptor (RID) que se une a receptores específicos en la superficie de la célula hospedera. (Tomado de Krishna 2005).

Proteínas de uniones estrechas.

Una función fundamental del epitelio y el endotelio es separar diversos compartimentos en el organismo y regular los compuestos que se intercambian entre ellos. Las uniones estrechas o TJ (del inglés “*Tight Junctions*”) entre células adyacentes forman la barrera para el paso de iones y moléculas a través del epitelio, así como el movimiento de proteínas y lípidos entre los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática de células polarizadas (González-Mariscal y col., 2003).

Las TJ están relacionadas también con las vías de transducción, transmitiendo señales entre el medio exterior e interior para regular procesos celulares, como la expresión de genes, la polarización, proliferación y diferenciación celular (Tsukita y col., 2008; Zihni y col., 2014). Las TJ son complejos de proteínas formadas por diferentes proteínas integrales de membrana, las cuales están en contacto con proteínas adaptadoras (con dominios PDZ) que las conectan con el citoesqueleto de actina (Fanning y Anderson, 2009; Van y col., 2009).

Dos tipos de proteínas integrales se encuentran en las TJ: proteínas transmembranales que atraviesan en varias ocasiones la membrana plasmática, como claudina y ocludina, y proteínas transmembranales de un solo pase, las cuales pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas e incluyen al receptor de coxsackievirus y adenovirus (CAR) y a JAM (del inglés, “*Junctional molecule adhesion*”). A pesar de que ocludina fue la primera proteína descrita en TJ, no es esencial para la formación de éstas (Schulzke y col., 2005); esta proteína regula el transporte de algunos iones pequeños a través del espacio paracelular y también se ha asociado con la biogénesis de pequeñas vesículas y la organización de dominios de membrana (Yu y Turner, 2008).

Las claudinas tienen la función de regular el pase de iones a través del espacio intercelular, además la trans-interacción con otras claudinas adyacentes son esenciales para la formación de TJ (Yu y col., 2005).

Las proteínas JAM por su parte, se han implicado en diversas funciones, entre las que están la adhesión célula-célula, la migración leucocitaria, la activación de plaquetas y la angiogénesis (Severson y Parkos, 2009). El mecanismo por el cual las proteínas JAM contribuyen a estos procesos no se conoce del todo, aunque algunas evidencias sugieren que interacciones homofílicas y heterofílicas son importantes para estas funciones (Mandell y Parkos, 2005).

Papel de las uniones estrechas en la interacción virus-célula

En los últimos años se ha incrementado la evidencia de que diversos virus interactúan con proteínas de uniones estrechas como parte de su ciclo infeccioso (Figura 10).

Algunos virus requieren de moléculas basolaterales para la unión y entrada a células polarizadas, las cuales son inaccesibles desde la cara apical de la célula debido a la acción de las uniones estrechas. Para poder lidiar con este problema, algunos virus han desarrollado mecanismos para abrir las uniones estrechas y alcanzar a sus receptores, mientras que otros usan a las moléculas de uniones estrechas como tales. La primera proteína de TJ identificada como receptor viral fue el receptor para coxsackievirus y adenovirus (CAR) (Bergelson y col., 1997). En el caso de adenovirus, es la unión con este receptor la que facilita la unión subsecuente a moléculas basolaterales, como integrinas, que median la entrada del virus. Para coxsackievirus la dinámica es diferente: para poder alcanzar el receptor CAR en las TJ, este virus se une en primera instancia al factor DAF (factor acelerador de decaimiento) presente en la zona apical del epitelio intestinal, esta interacción provoca una cascada de señalización que induce un rearrreglo del citoesqueleto que a su vez facilita el transporte de DAF junto con las partículas virales hacia las uniones estrechas, en donde el virus finalmente puede unirse a su receptor CAR y entrar a la célula (Coyne y Bergelson, 2006).

Se ha propuesto que el virus de la hepatitis C (HCV) interactúa con ocludina para infectar células humanas, esto debido a que la sobre-expresión de esta proteína en células no susceptibles permite la infección del virus (Von y Rice, 2008). Por otro lado, se ha identificado a JAM-A como receptor para reovirus y el calicivirus

felino (Barton y col., 2001; Makino y col., 2006), y también ha demostrado que JAM-A es importante, junto con ocludina y ZO-1, para la internalización de rotavirus, actuando como co-receptor (Torres-Flores y col., 2015).

Además de intervenir en la entrada de virus, el papel de las uniones estrechas va más allá en algunos virus respiratorios como influenza y coronavirus, los cuales interactúan con proteínas con dominios PDZ como ZO-1, MUPP 1, MUPP 2 y MUPP3 provocando una alteración en las uniones estrechas, generando la pérdida de polarización celular. Este efecto se cree que beneficia al virus al permitirle propagarse y así infectar otros tejidos (Teoh y col., 2010; Golebiewski y col., 2011).

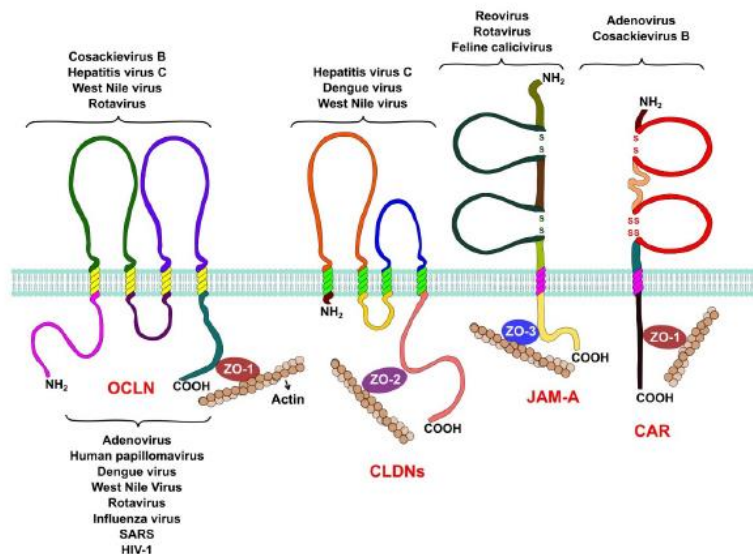


Figura 10. Uniones estrechas y replicación viral. Ocludina (OCLN) es requerida por hepatitis C, coxsackie virus y rotavirus durante el proceso de entrada en la célula huésped. West Nile es capaz de abrir las TJ para su diseminación en sangre. Claudina es usada por hepatitis C y dengue como factor de entrada. Reovirus y calicivirus felino utilizan JAM-A como receptor, mientras que rotavirus lo requiere como co-receptor. Como su nombre lo indica CAR es usado como receptor por adenovirus y coxsackievirus. Influenza, coronavirus y West Nile utilizan proteínas de la *zonula ocludens* (ZO-1) para diseminarse a otros tejidos (Tomada de Torres-Flores y Arias 2015).

ANTECEDENTES

En un estudio realizado por Brinker y colaboradores en el año 2000, se analizó la infectividad de los serotipos de astrovirus 1 a 7 en múltiples líneas celulares de primates y de otros mamíferos no-primates (Tabla 1). La propagación de los siete serotipos fue exitosa en las líneas celulares humanas Caco-2, T84 y HT-29, y la línea celular de mono verde africano MA104. La única línea celular que no es de primate capaz de sustentar la infección por astrovirus fue BHK-21, y el único serotipo capaz de establecer infección exitosa en ésta fue el 2.

Llama la atención observar una diferencia en el grado de infectividad de diferentes serotipos en una misma línea celular, lo cual podría indicar, entre otras cosas, una diferencia en el receptor que utilizan los diferentes serotipos para unirse a la célula y de este modo iniciar la infección.

Tabla 1. Replicación de serotipos de astrovirus en múltiples líneas celulares.

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

El título relativo de astrovirus fue determinado por ELISA.

OD, muestra sin diluir negativa

+ Muestra positiva sólo en la no diluida

++ Muestra positiva diluida 1×10^{-1}

+++ Muestra positiva diluida 1×10^{-2}

++++ Muestra positiva diluida 1×10^{-3}

(Tomado de Brinker y col., 2000).

En un trabajo anterior, Geigenmüller y col. (1997) transfectaron RNA viral de HAstV serotipo 1 en la línea celular BHK-21, la cual como se mencionó anteriormente sólo es susceptible a la infección con el serotipo 2. Interesantemente observaron que el virus se producía eficientemente, por lo que el

paso “limitante” de la infección de este serotipo en dicha línea celular se encuentra en el proceso de entrada, posiblemente a nivel del receptor celular (Tabla 2).

Tabla 2. Transfección en células BHK y Caco-2 con RNA aislado de células Caco-2 infectadas con HAstV-1 y título del virus infeccioso recuperado.

Cell type transfected	% Transfected cells	Recovery of infectious virus from:	
		Transfected cells (1st passage) (IU/ml)	Infected CaCo-2 cells (2nd passage) (IU/ml)
CaCo-2	0.7	6.7×10^8	7.5×10^8
BHK	17	3.7×10^8	7.6×10^8

^a Total cellular RNA from virus-infected cells was isolated with TriReagent (Molecular Research Inc., Cincinnati, Ohio).

(Tomado de Geigenmüller y col., 1997).

En este trabajo nos propusimos elucidar la infectividad y la unión de tres diferentes serotipos de HAstV (1, 2 y 8) a diferentes tipos celulares y caracterizar preliminarmente la molécula celular a la cual se unen los HAstV .

HIPÓTESIS

La diferencia en el tropismo celular de los diferentes serotipos de astrovirus se debe a interacciones tempranas (antes de la entrada a su célula huésped) virus-célula.

OBJETIVO

Caracterizar las interacciones tempranas de HAstV con células permisivas, parcialmente permisivas y resistentes a la infección para evaluar su papel en el tropismo celular.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la infectividad de los serotipos 1, 2 y 8 de HAstV en células con diferente permisividad (Caco-2, MA104, Vero y MDCK II)
2. Determinar la unión de los tres virus a la superficie de células permisivas (Caco-2, MA104 y Vero) y no permisivas (MDCK II).
3. Determinar la producción de progenie viral de HAstV serotipos 1, 2 y 8 en células con diferente permisividad (Caco-2, MA104 y Vero).
4. Caracterizar la posible diversidad de receptores para HAstV-1, HAstV-2 y HAstV-8 en células permisivas (Caco-2, MA104 y Vero).
5. Determinar el papel de JAM-A en la infectividad de los tres serotipos de HAstV.
6. Definir la composición mínima de las proteínas que componen las partículas infecciosas de HAstV.

METODOLOGÍA

Células y virus. La línea celular C2Bbe1, derivada de Caco-2 (ATCC), se cultivó en medio Dulbecco modificado, alto en glucosa (DMEM-HG) (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, U.S.A.), suplementado con aminoácidos no esenciales (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, California) y suero fetal bovino (SFB) al 15% a 37°C y atmósfera de 10% de CO₂. Las líneas celulares MDCK II de riñón de perro y Vero y MA104, derivadas de epitelio de riñón de mono verde (*Cercopithecus aethiops*), se cultivaron en medio DMEM-RS (medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco) (Thermo Scientific) (Pittsburg, USA) en 5% de suero fetal bovino y un ambiente con 5% de CO₂ a 37°C. Las líneas celulares SKCO-15 y SIA2 (*knockout* para JAM-A obtenida a partir de células SKCO-15) fueron donadas por la Dra. Kim Y. Green del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas del NIH, Bethesda Maryland, USA, y se cultivaron en medio DMEM-HG con penicilina-estreptomicina (10,000 UI/mL - 10,000 mg/mL), enriquecido con SFB al 10% en atmósfera de 10% de CO₂ a 37°C; para la línea celular SIA2 se usó este mismo medio adicionado con puromicina (5 µg/mL).

Las cepas de astrovirus serotipos 1 (HAstV-1b), 2 (HAstV-2 Oxford) y 8 (HAstV-Yuc-8) se propagaron en células Caco-2 C2Bbe1 previa activación con 200 µg/ml de tripsina a 37°C por 60 min. El virus, a una multiplicidad de infección (MOI) de 5, se añadió a células Caco-2 por 1 h a 37°C, se retiró el inóculo, y se agregó MEM (medio esencial mínimo), incubándose durante 16 h a 37°C. Para lisar las células, éstas se congelaron y descongelaron 3 veces y se centrifugaron a 600xg por 10 min para retirar los restos celulares. El título viral se determinó como se describe más abajo.

Anticuerpos y reactivos. El anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra HAstV-8 (cepa Yuc8;), así como los anticuerpos policlonales producidos en ratón y conejo dirigidos contra las espículas de HAstV-1 (cepa Oxford; α-espícula1), HAstV-2 (cepa Oxford; α-espícula2) y HAstV-8 (cepa Yuc8; α-espícula8) fueron generados en nuestro laboratorio inmunizando ratones o conejos con las espículas

recombinantes de los tres serotipos estudiados. En los ensayos de inmunoperoxidasa, western blot y far western, se utilizaron anticuerpos anti-IgG de conejo o ratón acoplados a peroxidasa (Perkin Elmer Life Sciences) (Waltham, USA).

Las espículas recombinantes utilizadas para los ensayos de far western fueron provistas por la Dra. Rebecca M. DuBois del Departamento de Ingeniería Biomolecular de la Universidad de Santa Cruz, California, USA.

Purificación de partículas virales. Monocapas confluentes de células Caco-2 clona C2Bbe1 en frascos de 150 cm² se infectaron con una MOI de 5 con los HAstV-1, -2 y -8 durante 16 h a 37°C, como se describió previamente. Para la purificación de los virus se siguió la metodología descrita por Sánchez-Fauquier (1994). Brevemente, se despegaron por raspado las monocapas de células infectadas y se lisaron congelando y descongelando 3 veces. Antes del proceso de purificación el lisado de células infectadas se trató con 200 µg/mL de tripsina por 60 min a 37°C, se clarificó el lisado por centrifugación a 2,000xg por 10 min, y el sobrenadante obtenido se filtró por una membrana con poros de 45 µm (Corning). Una vez filtrados, los sobrenadantes se ultracentrifugaron a 50,000xg por 16 h a 4°C en el rotor SW55Ti (Beckman Coulter) usando tubos de polipropileno (Beckman Coulter), para sedimentar el virus. El botón sedimentado se resuspendió en 4 ml de buffer TNE (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 0.1 M, EDTA 10 mM). Esta suspensión se ajustó a 0.5% v/v con el detergente octil glucósido (stock al 5%) y se incubó por 30 min a 4°C para liberar el virus asociado a membranas. Se ultracentrifugó una vez más a 200,000xg por 2 h en el rotor SW55Ti (Beckman Coulter) a través de un colchón de sacarosa al 30% en TNE para sedimentar el virus. El virus purificado se resuspendió en 500 µL de buffer TNE y se guardó en alícuotas a -70°C. Se guardaron también alícuotas de cada uno de los pasos de la purificación para determinar el papel de VP25 en la infectividad de astrovirus.

Tratamiento con tripsina para remover VP25. El virus purificado se trató una vez más con tripsina (200 µg/mL), para digerir las proteínas virales que no se

hubieran cortado eficientemente; posteriormente el virus se concentró mediante un colchón de sacarosa al 30% en TNE centrifugándolo a 200,000xg en el rotor SW55Ti (Beckman Coulter). La pastilla obtenida se resuspendió en el buffer TNE y se analizó por Western blot.

Western blot. El virus purificado se mezcló con amortiguador de carga (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% β -mercaptoetanol); después las muestras se hirvieron por 5 min y se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE al 10%. Transcurrido este tiempo, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) a 130 mA por 1 h. Posteriormente, la membrana se bloqueó por 60 min con leche descremada al 5% (Carnation) en PBS-Tween al 0.1%. La membrana se incubó con un anticuerpo policlonal α -Yuc8 hecho en conejo (1:2,000) diluido en leche descremada (1%) en PBS-Tween al 1%. La membrana se lavó con PBS-tween (0.1%) tres veces por 10 min y se añadió el anticuerpo secundario diluido 1:3,000 (dirigido contra IgG de conejo) acoplado a peroxidasa, por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó la membrana nuevamente y se detectaron las proteínas utilizando el sistema Western Lightning (Perkin Elmer) (Waltham, USA) exponiéndose a una película hipersensible Kodak (Rochester, USA).

Ensayos de infectividad. Se llevó a cabo como lo describió Méndez y colaboradores (Méndez y col, 2002), utilizando un ensayo de inmunoperoxidasa. Brevemente, monocapas confluentes de células Caco-2 crecidas en placas de 96 pozos se lavaron dos veces con MEM y se añadió el virus por 1 h a 37°C. Posteriormente las células se lavaron con MEM y se incubaron por 16 h a 37°C. Después de este tiempo las células se fijaron con metanol absoluto por 20 min, después de lo cual se lavaron con PBS y se incubaron con los siguientes anticuerpos policlonales, dependiendo de la cepa de HAstV en cuestión: suero α -Yuc8 preparado en conejo, dirigido contra las partículas virales completas, diluido 1:2,000 (serotipo 8); suero α -espícula 1 preparado en ratón, diluido 1:1,000 (serotipo 1); o suero α -espícula 2 preparado en ratón, diluido 1:1,000 (serotipo 2), por 2 h a 37°C. Posterior a este periodo se lavaron las células con PBS,

incubándose con un anticuerpo anti-Ig de conejo acoplado a peroxidasa (1:3,000) (serotipo 8) o anti-Ig de ratón acoplado a peroxidasa (1:3,000) (serotipos 1 y 2) por 2 h a 37°C. Por último, las células se lavaron nuevamente con PBS y se agregó carbazol y peróxido de hidrógeno, en las concentraciones reportadas (Méndez y col., 2002) hasta observar el desarrollo de color. Se lavó con agua y las unidades formadoras de focos se contaron en un microscopio invertido (Nikon, Japón).

Determinación de la progenie viral. Se realizó la infección a una MOI de 0.3 con los 3 serotipos HAstV, como se describe en el apartado anterior, en las líneas celulares permisivas a la infección (Caco-2, MA104 Vero), las células se lisaron para liberar las partículas virales del interior de las células sometiénolas a 3 ciclos de congelamiento (-70°C) y descongelamiento (temperatura ambiente). Posteriormente el virus se activó con tripsina y se determinó el título viral como se indicó anteriormente.

Marcaje radioactivo de partículas virales. Se infectaron monocapas de células Caco-2 clona C2Bbe1 de 50cm³ con los diferentes serotipos de astrovirus a una multiplicidad de infección de 6 durante 1 h a 37°C. Posteriormente se lavaron dos veces con MEM sin suero y se incubaron por 8h a 37°C, transcurrido este tiempo se cambió el medio por MEM sin metionina y se añadieron 50µCi/ml de metionina marcada con ³⁵S y se incubó durante 16 h a 37°C. Después de este tiempo se lisaron las células congelando y descongelando 3 veces y se procedió a purificar el virus mediante el protocolo antes descrito.

Ensayo de unión. Se cultivaron monocapas en placas de 48 pozos de las diferentes líneas celulares trabajadas, una vez confluentes, se lavaron dos veces con PBS y se bloquearon con BSA al 2% en PBS por 1h a temperatura ambiente y después por 15 min en hielo. Las células se incubaron con 5µl de virus marcado radioactivamente durante 1h en hielo, se lavaron 3 veces con PBS y se lisaron con 50µl de solución de lisis (Tritón 0.1%, NaCl 150mM, Tris-HCl pH8 50mM). Los lisados se transfirieron a un vial de centelleo y se les añadió 3mL de líquido de centelleo EcoLite (MP Biomedicals Inc). La cuantificación del virus unido marcado se llevó a cabo en el contador de centelleo LS Analyzer (Beckman).

Far western. Se realizó el enriquecimiento de proteínas de membranas de las líneas celulares trabajadas en este proyecto usando el kit Qproteome Cell Compartment (QUIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una solución de 15-20 μ l de proteínas de membrana se mezclaron con amortiguador de carga (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% β -mercaptoetanol), hirviendo las muestras por 5 min, y se separaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10%. Las proteínas se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa (Milipore), por 60 min a 130 mA. La membrana se bloqueó por 1 h a temperatura ambiente en agitación, con 5% de leche descremada (Carnation) en PBS-Tween al 0.1%. La membrana se incubó posteriormente con una solución de las espículas 1, 2 u 8, a una concentración de 100 μ g/mL en leche descremada al 1% en PBS-Tween al 0.1% en agitación por toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron las membranas dos veces con PBS-Tween al 0.1% y se incubaron con el anticuerpo primario (dirigido contra las espículas de diferentes serotipos) diluido en la misma solución de leche que las espículas, por 1 h a temperatura ambiente. Al término de la incubación la membrana se lavó con PBS-Tween (0.1%) tres veces por 10 min y se añadió el anticuerpo secundario (contra inmunoglobulinas de ratón o conejo, de acuerdo al experimento) acoplado a peroxidasa, por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó la membrana nuevamente y se detectaron las proteínas utilizando el sistema Western Lightning (Perkin Elmer) (Waltham, USA) exponiéndose a una película hipersensible Kodak (Rochester, USA).

Identificación de proteínas por espectrometría de masas. Las bandas del peso molecular correspondiente a las proteínas reconocidas por las espículas en los ensayos de far western (aprox 70 kDa) se cortaron a partir de un duplicado del gel teñido por Coomassie. Estas bandas se analizaron por espectrometría de masas en el Laboratorio Universitario de Proteómica del Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico para las Ciencias Genómicas, localizado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se realizó la extracción de péptidos mediante digestión en gel con tripsina, y los péptidos se separaron en un espectrofotómetro de masas (LTQ Orbitrap XL Thermo Fisher) acoplado a HPLC. La identificación de las

proteínas se realizó con el programa Proteome Discoverer 1.4 con los siguientes parámetros: motor de búsqueda Sequest HT, Decoy database FDR 0.01 y FDR 0.05, precursor mass tolerance 20 ppm y fragment mass tolerance de 0.6 Da.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos en los ensayos de infectividad, unión y rendimiento viral se analizaron por medio de GraphPad Prism realizando una prueba tipo ANOVA de una vía mediante una prueba de comparación de Turkey con un nivel de significancia del 99.9% ($P < 0.001$).

RESULTADOS

OBJETIVO 1: Determinar la infectividad de los serotipos 1, 2 y 8 de HAstV en células con diferente permisividad (Caco-2, MA104, Vero y MDCK II).

Estudios anteriores han revelado que diferentes serotipos de astrovirus muestran un diferente tropismo celular, es decir, infectan de manera diferencial a distintos tipos de células (Brinker y col., 2000). Esto puede deberse, entre otras cosas, a la presencia de receptores o correceptores específicos para cada serotipo viral en la membrana plasmática. Inicialmente, determinamos la permisividad de cuatro líneas celulares a la infección por tres diferentes serotipos de HAstV. Las líneas celulares Caco-2, MA104 y Vero se han reportado como las más permisivas a la infección por HAstV de serotipos 1 y 2, mientras que las células MDCK II parecen ser refractarias a la infección por estos dos serotipos (ver Tabla1). La permisividad de diferentes líneas celulares a la infección por HAstV-8 no ha sido evaluada.

Para evaluar la permisividad de las cuatro líneas celulares mencionadas a los serotipos de HAstV 1, 2 y 8 que utilizaremos en este proyecto, se determinó la infectividad de cada serotipo mediante un ensayo de inmunoperoxidasa. De acuerdo a los resultados obtenidos, la línea celular con mayor permisividad para la infección para los serotipos 1, 2 y 8 fue Caco-2, seguida de MA104 y Vero, que se comportaron de manera similar (Figura 11). Sin embargo, la relación entre la infectividad de Caco-2 respecto a la de MA104 y Vero es diferente entre el serotipo 8 y los serotipos 1 y 2. La infectividad de serotipo 8 en Caco-2 es del orden de 1000 mayor que en MA104 y Vero, mientras que para los serotipos 1 y 2 esta relación es únicamente de 100 veces. Las células MDCK II no fueron permisivas a la infección con ninguno de los serotipos estudiados.

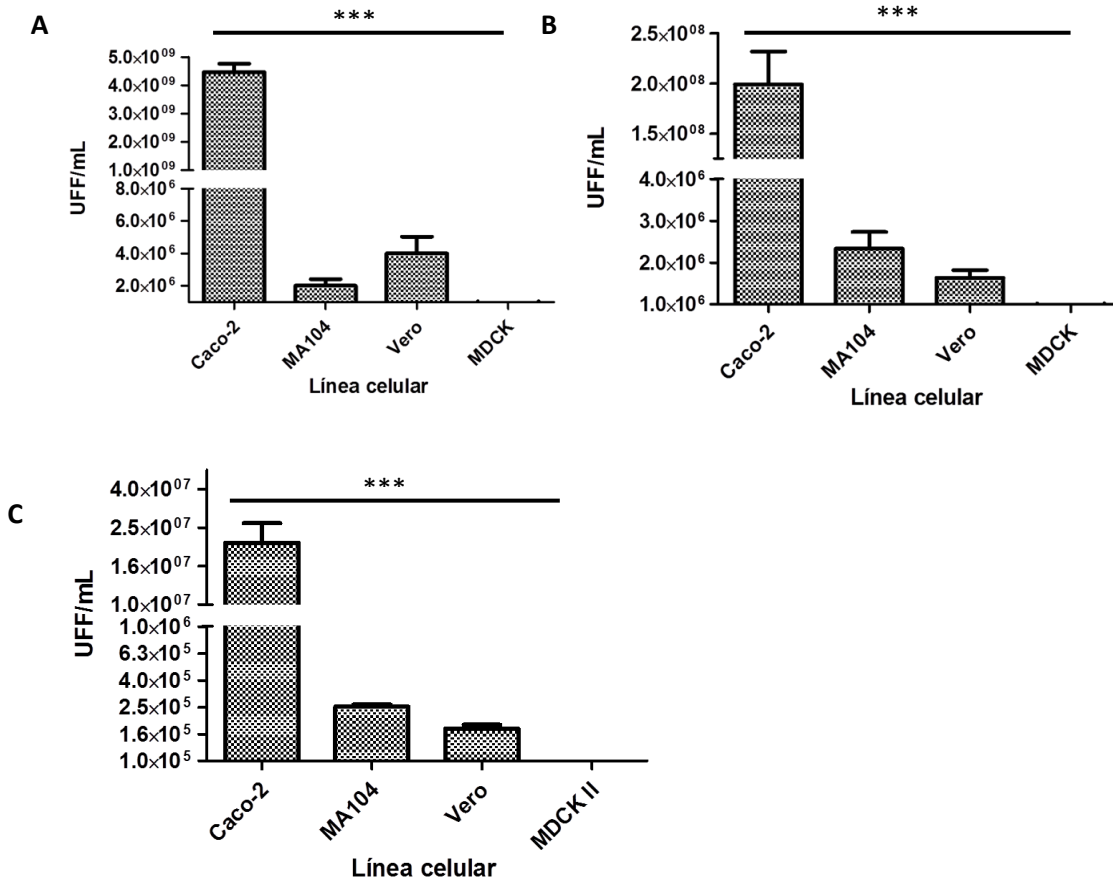


Figura 11. Infectividad de astrovirus serotipos 1, 2 y 8 en diferentes líneas celulares. Cada línea celular se infectó ya sea con el serotipo 8 (A), serotipo 1 (B) y serotipo 2 (C). A las 16 hpi se determinó el título viral mediante un ensayo de inmunoperoxidasa. Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes. Las células MDCK II no fueron susceptibles a la infección. . ***, P<0.001

OBJETIVO 2. Determinar la unión de los tres virus a la superficie de células permisivas (Caco-2, MA104 y Vero) y no permisivas (MDCK II).

Como se observó en los resultados anteriores, los virus infectan de manera diferencial a las distintas líneas celulares evaluadas. Esto puede deberse a que las partículas virales se unen con diferente eficiencia a las diferentes células o a

diferencias en algún paso posterior a la unión, como durante el proceso de entrada, o bien durante otros estadios del ciclo de replicación viral.

Por esta razón decidimos evaluar la unión de los serotipos 1, 2 y 8 de HAstV a la superficie de los diferentes tipos de células. Para ésto, se procedió a marcar el virus con ^{35}S -metionina como se describe en la metodología. Se añadió el virus marcado a monocapas de células durante 1 h a 4°C , posteriormente se lavaron las partículas no unidas y se lisaron inmediatamente las células con solución de lisis. El porcentaje de virus unido se determinó midiendo las cuentas por minuto (cpm) presentes en los lisados celulares.

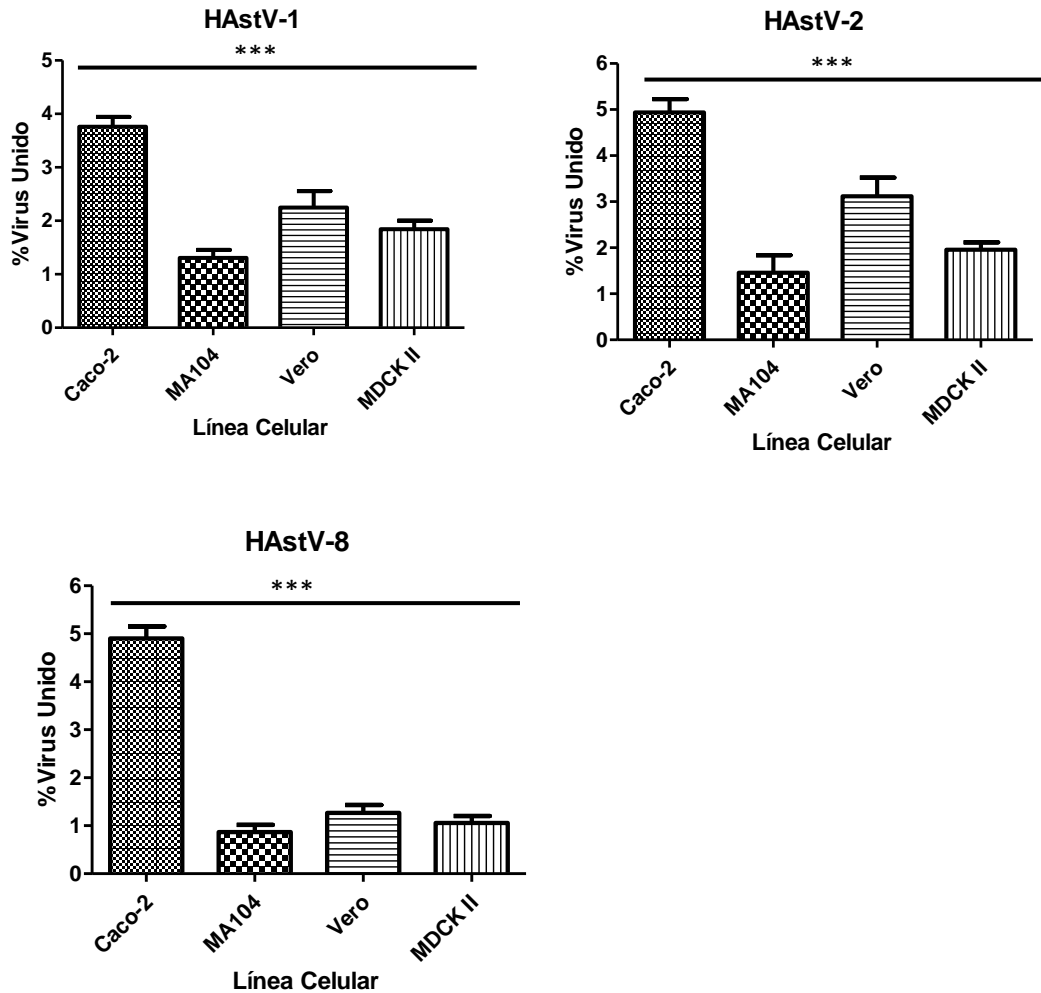


Figura 12. Unión de los diferentes serotipos de HAstV a células permisivas y no permisivas. Los serotipos 1, 2 y 8 marcados radioactivamente con ^{35}S -Met se dejó adsorbieron durante 1h a 4°C en las diferentes líneas celulares, transcurrido este tiempo se lavó el virus no unido y se lisaron las células con solución de lisis. Posteriormente se cuantificaron las cpm en el lisado y se calculó el % de virus unido respecto al virus inicial añadido, el cual se tomó como el 100%. Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes. ***, $P < 0.001$

Como se observa en la figura 12, Caco-2 es la línea celular a la que se une un mayor porcentaje de virus de los tres serotipos estudiados, seguida de las otras líneas celulares, a las cuales HAstV parece unirse de manera similar. Sin embargo, esta diferencia no es tan grande como en el caso de la infectividad, esto es, en el número de células que se infectan, lo que sugiere que podrían existir otros factores además de los implicados en la unión que interfieren con la

infección de astrovirus en las líneas celulares estudiadas. Interesantemente, el virus fue capaz de unirse a la línea celular MDCK II (no susceptible a la infección) tan eficientemente como a las células MA104 y Vero, lo cual sugiere que posiblemente en esta línea se expresa el receptor celular en su superficie pero puede carecer de él o los correceptores necesarios para la entrada del virus; o bien de factores intrínsecos que impiden que se lleve a cabo la replicación del virus en su interior.

OBJETIVO 3: Determinar la producción de progenie viral de HAstV serotipos 1, 2 y 8 en células con diferente permisividad (Caco-2, MA104 y Vero)

Para determinar si la marcada diferencia en la infectividad de HAstV entre líneas celulares reflejaba la capacidad de las células para replicar el virus en su interior y por lo tanto para producir una mayor o menor progenie viral, es decir, para producir un número diferente de virus infecciosos por cada célula infectada, se determinó la progenie viral de HAstV-1, -2 y -8 en las líneas celulares permisivas (Caco-2) y parcialmente permisivas (MA104 y Vero). Para esto, monocapas de las células antes mencionadas se infectaron con una multiplicidad de infección (la cual determina el porcentaje de células que se infectarán) igual para cada uno de los serotipos de astrovirus, durante 18 h; transcurrido el tiempo de infección las células se lisaron y se determinó el título viral presente en el lisado total (Fig. 13). A partir de este título se calculó el rendimiento viral y, con base en él, se calculó el número de virus infecciosos producidos por cada célula infectada (Tabla 3).

Similar a los resultados obtenidos en la infectividad, la línea celular en la que se obtuvo la mayor producción de virus infecciosos de los tres serotipos fue Caco-2, seguida de Vero y MA104, las cuales tuvieron un comportamiento similar (Fig. 13). Interesantemente, el número de partículas virales infecciosas producidas por cada célula individual fue variable para las diferentes líneas celulares y para cada uno de los serotipos virales (Tabla 3). Así, en células Caco-2 se obtuvieron 136, 441 y 673 virus por célula para los serotipos 1, 2 y 8, respectivamente, mientras que el

serotipo 1 tuvo una producción de progenie en células MA104 de 45 menos y en Vero, de 34 veces menos. En el caso de serotipo 2, la progenie viral fue 17 veces menor en MA104 que en Caco-2 y únicamente 7 veces menor en Vero que en Caco-2. Finalmente, para serotipo 8 la diferencia en progenie viral fue de 134 y 19 veces en MA104 y Vero, respectivamente, en relación a Caco-2. Estos resultados sugieren que el tropismo de los virus para las diferentes células está limitado no sólo en el proceso de entrada de los virus a la célula, sino también, y de manera principal, en algún paso de su replicación posterior a la unión de virus a la superficie celular.

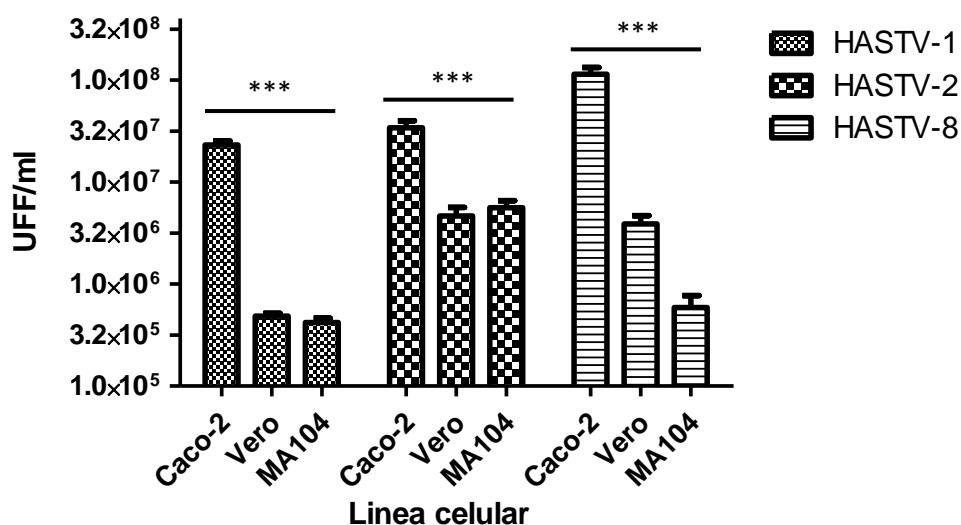


Figura 13. Determinación del rendimiento viral de HASTV-1, HASTV-2 y HASTV-8 en células permisivas y parcialmente permisivas a la infección. Células Caco-2, MA104 y Vero fueron infectadas por los tres serotipos de HASTV estudiados a una MOI de 0.3 por 18 h, transcurrido este tiempo las células se lisaron con congelación y descongelación y se determinó el título del virus producido durante el ciclo de replicación. La titulación del rendimiento viral en cada línea celular se realizó en células Caco-2, a partir de este título viral se calculó el número de partículas virales infecciosas producidas por célula infectada (Tabla 3). Las barras representan el error estándar de la media de 3 ensayos independientes. ***, P<0.001

Tabla 3. Partículas virales de HAstV infecciosas producidas por célula infectada en diferentes células permisivas.

	HAstV-1	HAstV-2	HAstV-8
Caco-2	136 ±31	441 ±86	673 ±120
MA104	3 ±1	26 ±17	5 ±4
Vero	4 ±2	65 ±17	36 ±29

OBJETIVO 4: Caracterizar la posible diversidad de receptores para HAstV-1, HAstV-2 y HAstV-8 en células permisivas (Caco-2, MA104 y Vero).

Con el fin de identificar posibles proteínas de membrana de células Caco-2, Vero y MA104 que fueran reconocidas por los serotipos 1, 2 y 8 de HAstV como posibles receptores para la infección viral, se realizaron ensayos de *far western*. Considerando que los virus se unen también a la superficie celular de las células MDCKII, éstas se incluyeron también en el análisis. Para ello se utilizó proteína VP25 producida recombinantemente en *E. coli* de los diferentes serotipos, donados gentilmente por la Dra. Rebecca DuBois de la Universidad de Santa Cruz, California, USA.

Esta técnica consiste en evaluar el reconocimiento de la espícula de HAstV hacia proteínas de membrana previamente separadas por SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La espícula unida se detecta mediante el uso de anticuerpos específicos y anticuerpos secundarios apropiados, como se describe en Materiales y Métodos (ver también Wu y Chen, 2007).

Para este experimento se extrajeron proteínas de membrana de las cuatro líneas celulares estudiadas y se realizó el ensayo de *far western*. Los resultados mostraron que cuando se utilizó la espícula de serotipo 1 se obtuvieron diversos patrones de bandas en las cuatro líneas celulares, indicando que esta espícula reconoce varias proteínas celulares de membrana (Fig. 14). Entre las proteínas

reconocidas, las bandas, entre 65 y 75 KDa sobresalen por su intensidad en el ensayo de far western, lo que tal vez indique el reconocimiento de un posible receptor celular. Los resultados fueron muy similares cuando se usó la espícula de serotipo 8 (Fig. 14). Como control, las proteínas de membrana de cada línea celular se revelaron con los anticuerpos correspondientes, omitiendo la incubación con la espícula específica. En el caso de la espícula de serotipo 2 el patrón de bandas que se obtuvo fue diferente lo que pudiera hablar del reconocimiento de receptores/correceptores diferentes a los de los otros dos serotipos estudiados, sin embargo, es necesario realizar más estudios para corroborarlo.

Interesantemente, pudimos observar que las espículas fueron capaces de reconocer proteínas de membrana procedentes de MDCK II, lo cual apoya nuestras observaciones anteriores que demuestran que el virus es capaz de unirse a esta línea celular aunque no se lleve a cabo la infección.

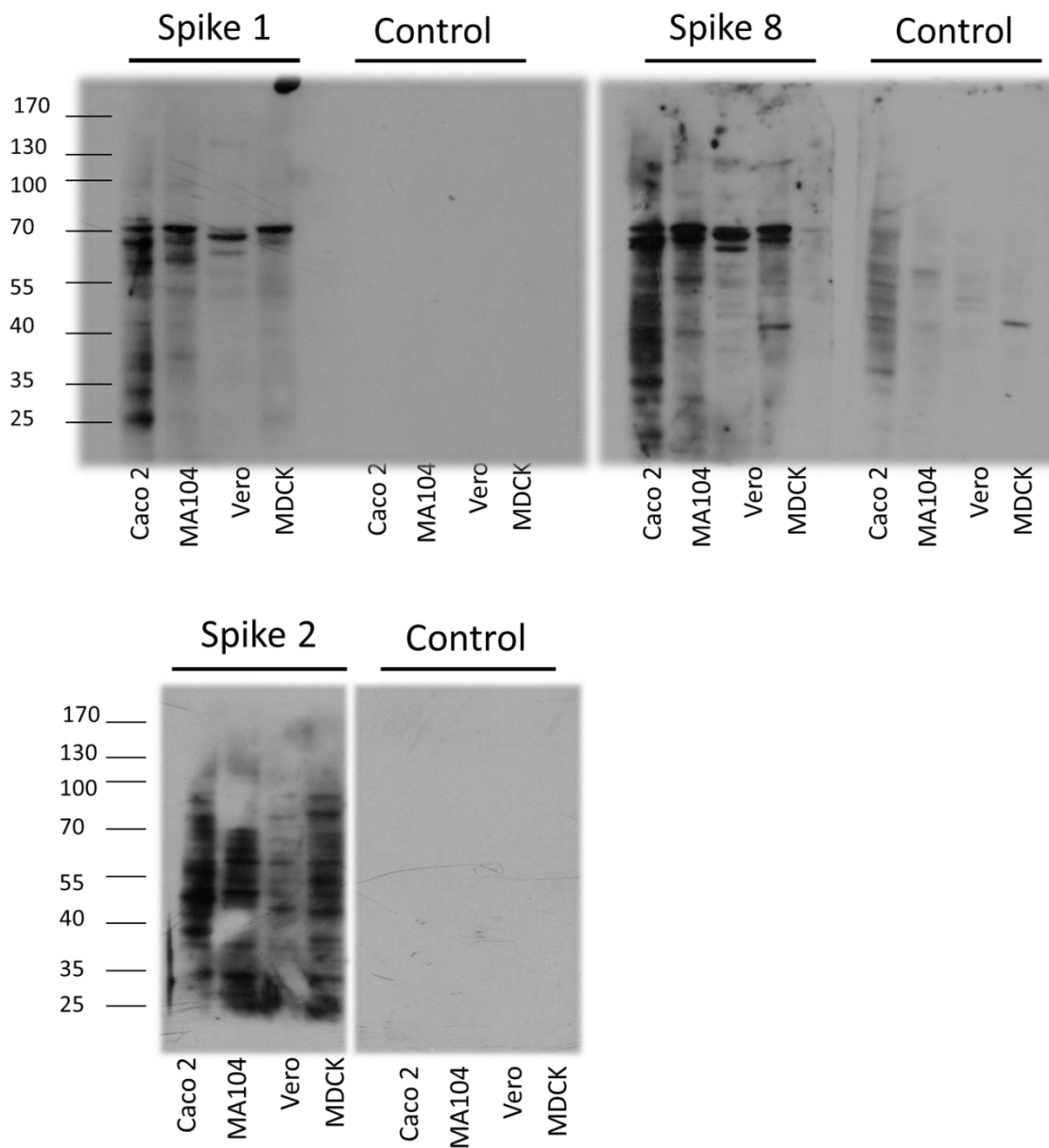


Figura 14. Ensayo de far western. Se incubaron las espículas de los serotipos 1, 8 y 2 de astrovirus por 12 h a 4°C con membranas de nitrocelulosa a las cuales se les había transferido previamente extractos de proteínas de membranas de las líneas celulares Caco-2, MA104, Vero, y MDCKII separadas por SDS-PAGE. Las espículas se revelaron con el anticuerpo anti-espícula 1, 2 u 8 por 1 h a temperatura ambiente. La unión del anticuerpo se reveló por quimioluminiscencia sobre una película fotosensible. Se muestra una imagen representativa de al menos tres experimentos independientes.

Identificación de las bandas por espectrometría de masas

Para identificar proteínas candidatas para actuar como receptores a los virus de serotipo 1 y 8 se separaron las muestras de membrana de las células Caco-2 en un gel de poliacrilamida corrido paralelamente y se cortó la región del gel correspondiente aproximadamente a 65-75 kDa. Las proteínas en esta región del gel se identificaron por espectrometría de masas en el Laboratorio Universitario de Proteómica del Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico para las Ciencias Genómicas. Se identificaron 201 proteínas diferentes, 23 de las cuales resultaron estar asociadas a la membrana citoplasmática de acuerdo a la base de datos de UniProt (Tabla 4). Cinco de estas proteínas han sido identificadas previamente como receptores virales (Tabla 5). Sin embargo, para determinar si alguna de estas proteínas está actuando como receptor para astrovirus se requieren efectuar análisis más profundos con cada una de ellas, como utilizar el sistema de RNAi para disminuir la síntesis de la proteína o el sistema CRISPR/Cas para anular su síntesis y evaluar esta disminución/anulación de la proteína sobre la unión o infectividad viral.

Tabla 4. Proteínas de membrana identificadas por espectrometría de masas.

Heat shock cognate 71 kDa protein	Junction plakoglobin	Plastin-2
Heat shock 70 kDa protein 1A	Syntaxin-binding protein	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHERF3
Ezrin	Cell-surface antigen heavy chain	Neutral amino acid transporter B
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	Isoform 10 of Fibronectin	Transferrin receptor protein 1
Isoform 5 of Radixin	Myoferlin	Cadherin-1
Lysosome membrane protein 2	Scavenger receptor class B member 1	Basigin
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein	Basal cell adhesion molecule
Afadin	Epsin-1	

Tabla 5. Proteínas identificadas por espectrometría de masas previamente reportadas como receptores virales.

Proteína	Virus
Heat shock 70 kDa protein	Rotavirus (Guerrero y col., 2002), Dengue (Reyes-Del Valle, 2005)
Neutral amino acid transporter B	Baboon Endogenous Retrovirus (Marin, 2000), RD114ysimian type D retroviruses (Rasko, 1999)
Transferrin receptor protein	Arenavirus del Nuevo mundo (Radoshitzky, 2007) , Hepatitis C (Martin, 2013), Parvovirus (Parker, 2001)
Lysosome membrane protein 2 (SCARB2)	Enterovirus 71 (Yamayoshi, 2009)
Scavenger receptor class B member 1 (SCARB1)	Hepatitis C (Scarselli, 2002)

OBJETIVO 5: Determinar el papel de JAM A en la infectividad de los tres serotipos de HAstV.

JAM A participa en la formación de uniones estrechas o “tight junctions”. Se ha reportado que esta molécula es importante para la infección de diversos virus gastrointestinales como rotavirus, reovirus y calicivirus felino, actuando como receptor o co-receptor. (Torres-Flores y Arias, 2015), por lo que nos pareció importante evaluar su participación en la infección por HAstV. Para esto, la Dra. Kim Y. Green del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas del NIH, Bethesda Maryland, USA, nos donó dos líneas celulares: SKCO-15 de intestino humano y

una línea proveniente de SKCO-15 *knockout* (por CRISPR/Cas) de JAM-A, a la que denominaron S1A2.

Para determinar el papel de JAM-A en la infección de astrovirus se realizaron titulaciones de los serotipos HAstV-1, HAstV-2 y HAstV-8 en las líneas celulares antes mencionadas. Los resultados mostraron un notorio aumento en la infectividad de los tres serotipos estudiados de alrededor de 10 veces en el caso de HAstV-1 y alrededor de tres veces para HAstV-2 y HAstV-8 en las células que no expresan esta proteína, indicando que JAM-A restringe la infección con HAstV (Figura 15).

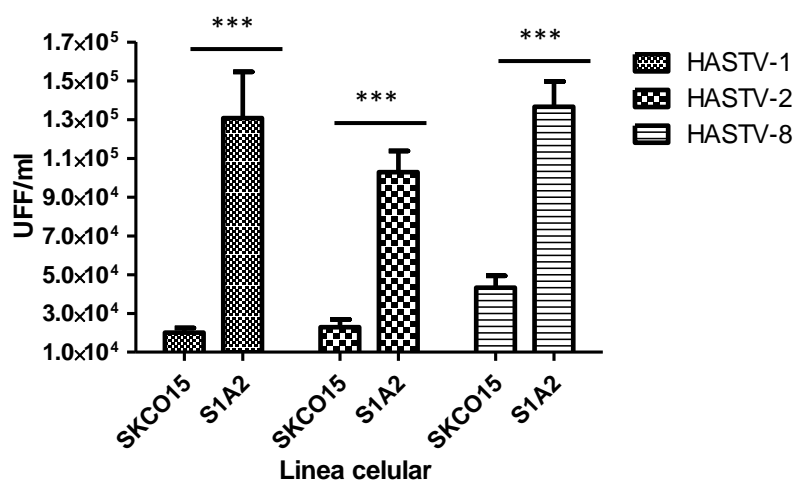


Figura 15. Infectividad de HAstV-1, HAstV-2 o HAstV-8 en células SKCO-15 (JAM-A +) y S1A2 (JAM-A -). Se adsorbieron los virus por 1 h a 37°C en monocapas confluentes de ambas líneas celulares, y a las 18 hpi se determinó el título viral mediante un ensayo de inmunoperoxidasa. Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes. ***, $P < 0.001$

OBJETIVO 6: Definir la composición mínima de las proteínas que componen las partículas infecciosas de HAstV.

De acuerdo a predicciones basadas en la secuencia de aminoácidos y en la estructura tridimensional de la proteína de cápside de astrovirus humanos, la proteína VP25 resultante de la digestión de VP70 con tripsina, no debería permanecer unida al core del virión (Dryden y col., 2012). Sin embargo, los

trabajos que han caracterizado la composición de proteínas de las partículas virales infecciosas han identificado de manera consistente la presencia de tres polípeptidos. En el caso de Yuc8, una proteína de 34 kDa, derivada del amino terminal de la poliproteína VP70 y dos proteínas, de 25 y 27 kDa, que difieren únicamente en 30 aminoácidos en su extremo amino terminal, y que se derivan del extremo C-terminal de VP70.

Para comprobar si la proteína de 25 kDa se pierde después del tratamiento con tripsina y por lo tanto pudiera no ser necesaria para la infectividad viral, se realizó una purificación de HAstV-8, en la cual el virus en el lisado celular se incubó con tripsina y se tomaron muestras en cada paso de la purificación para analizar las proteínas virales por *western blot* y tinción con plata.

Como se observa en la Figura 16, en el lisado inicial (Lis no act) están presentes las proteínas de cápside características de HAstV inmaduro, principalmente VP70 y VP90 (70 y 90 kDa respectivamente). Una vez que el lisado se procesó proteolíticamente por tripsina (Lis act) se observan las proteínas del virión maduro, correspondientes al core VP34 (34 kDa) y a las espículas VP25 y VP27 (25 y 27 kDa). Curiosamente, en los primeros pasos de la purificación se observa mayor proporción de VP25 que de VP27; sin embargo, durante el proceso de purificación se pierden cantidades considerables de VP25, resultando en un virus que contiene en su mayoría VP27 puesto que la banda correspondiente a VP25 es muy tenue (P3).

A pesar del tratamiento inicial con tripsina, en el precipitado final de la purificación (P3) aún se observa parte de VP70 sin procesar y parcialmente procesada. Para probar si volviendo a procesar una vez más con tripsina se puede eliminar a toda la VP25 restante, se volvió a tratar con tripsina (200 µg/mL) y se concentró el virus resultante mediante un colchón de sacarosa, tal como se hace en la purificación (ver metodología). Como se observa en la Figura 17, logramos procesar el virus presente y obtuvimos partículas virales en las que no se detectó VP25 (P4).

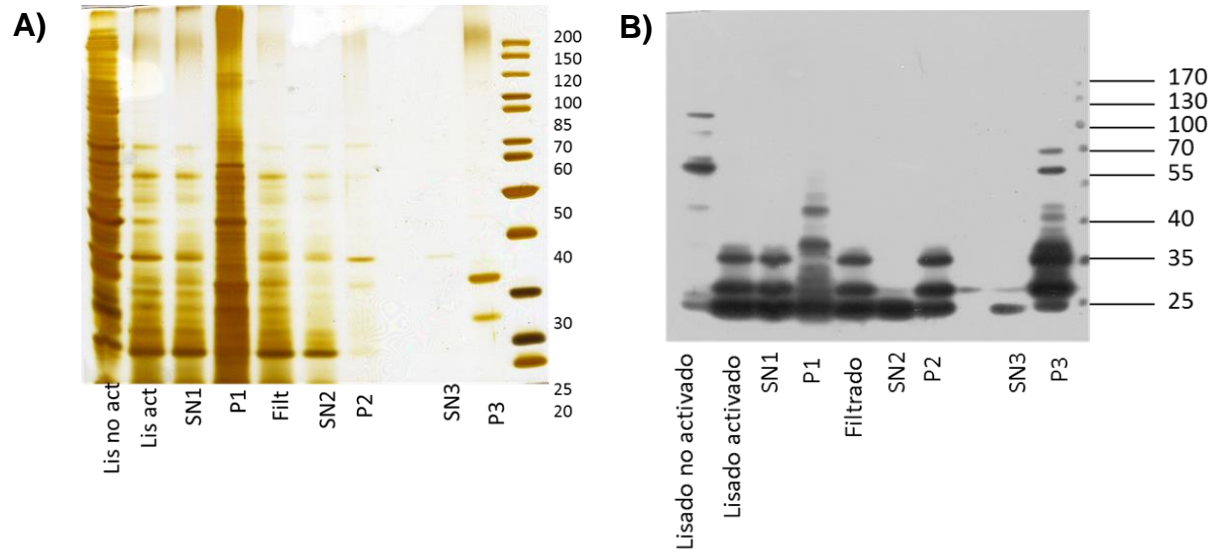


Figura 16. Seguimiento de las proteínas estructurales de HAstV-8 durante la purificación. Se infectaron células Caco-2 a una MOI de 10 durante 16h a 37°C. Después de este tiempo las células se lisaron por congelación y descongelación (lisado no activado) y posteriormente el lisado se trató con 200µg/ml de tripsina por 1h a 37°C (lisado activado). Después de este tratamiento, el lisado se clarificó mediante centrifugación a 2,000xg por 10 min tomando muestras del sobrenadante (SN1) y del pellet (P1). El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana con poros de 0.45 µm (filtrado) para eliminar restos celulares. El virus presente en el filtrado anterior se concentró mediante una centrifugación a 50,000xg por 16 h y se guardó el sobrenadante (SN2). Para liberar el virus de membranas, el pellet (P2) se resuspendió en octil glucósido 0.5% y se incubó por 30 min a 4°C. Finalmente el virus se concentró y purificó mediante un colchón de sacarosa al 30% en TNE a 200,000xg por 2h desechando el sobrenadante (SN3) y resuspendiendo el pellet final (P3) en TNE. A) Tinción con plata de proteínas presentes en cada fracción de la purificación de partículas virales. B) seguimiento de las proteínas estructurales de HAstV-8 durante la purificación. Se utilizó el anticuerpo policlonal dirigido a las proteínas de cápside (core y espícula) de astrovirus humano serotipo 8.

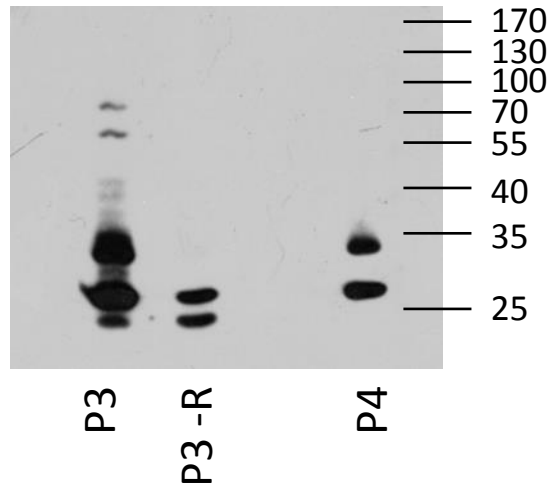


Figura 17. Seguimiento de las proteínas estructurales de HAstV-8 después de la segunda digestión con tripsina. El virus purificado proveniente del experimento anterior se digirió una vez más con tripsina (200 µg/mL) y se centrifugó a través de un colchón de sacarosa al 30% h a 200,000 xg. Las proteínas virales en el pellet de esta centrifugación se analizaron mediante Western blot con un anticuerpo dirigido contra las proteínas de cápside. P3, pellet del virus purificado proveniente del experimento anterior (Fig. 16); P3-R, virus purificado digerido por segunda vez con tripsina; P4, virus concentrado después de la segunda digestión con tripsina.

Para elucidar si VP25 es esencial para que el virus sea infeccioso, se tituló cada una de las muestras tomadas durante los pasos de purificación, así como del virus final sin la proteína VP25. Como se observa en los resultados (Tabla 6), el virus sin VP25 (P4) no pierde infectividad de manera significativa en comparación con el virus que presenta VP25 (P3), por lo que esta proteína parece no ser necesaria para que el virus sea infeccioso.

Tabla 6. Determinación del título viral en cada paso de la purificación de partículas virales de HAstV-8.

Muestra	Título (UFF/mL)	Volumen	Cantidad total de virus infeccioso
Lisado no activado	-	5mL	-
Lisado activado	1.98×10^8	5mL	9.7×10^8
SN1	4.73×10^8	5mL	2.36×10^9
P1	-	1mL	-
Filt	3.6×10^8	5mL	1.79×10^9
SN2	-	5mL	-
P2	5.1×10^8	4mL	2.04×10^9
SN3	1×10^4	5mL	5×10^4
P3	2.08×10^9	250uL	7.16×10^8
P3R (re-activado)	4.2×10^9	100uL	4.2×10^8
SN4	-	5mL	-
P4	9.49×10^8	150uL	1.42×10^8

DISCUSIÓN

La capacidad de un virus para infectar diferentes tipos celulares se denomina tropismo. Una célula es susceptible si presenta en su superficie los receptores necesarios para el reconocimiento viral; por otro lado, una célula es permisiva si presenta todos los componentes intracelulares y extracelulares que permiten la replicación viral (Flint y col., 2015). Por lo tanto, para que se lleve a cabo una infección viral exitosa es necesario que la célula presente ambas características. En el caso de astrovirus, un virus causante de gastroenteritis, la infección puede llevarse a cabo en una amplia variedad de huéspedes. Actualmente se conocen ocho serotipos clásicos capaces de causar esta afección en humanos (Méndez y Arias, 2013).

En este trabajo evaluamos la capacidad de tres serotipos de HAstV (1, 2 y 8) para infectar líneas celulares de diferente origen: Caco-2, proveniente de un carcinoma de colon humano; MA104 y Vero, epiteliales de riñón de mono verde y; MDCKII, epiteliales de riñón de perro. Se observó que Caco-2 fue la línea celular en la que los tres serotipos evaluados se replicaron más eficientemente, obteniéndose títulos virales hasta 1000 veces mayores en comparación con los obtenidos en las líneas celulares Vero y MA104. En las células MDCKII no se observó replicación alguna. El hecho de que un virus infecte diferencialmente varios tipos celulares es común, como se ha reportado para diversos virus, como dengue (Diamond y col., 2000), rotavirus (Londrigan y col., 2000) e influenza (Matrosovich y col., 2004). El que los HAstV se repliquen más eficientemente en Caco-2 no resulta extraño, ya que el tipo celular al que pertenece esta línea (intestino humano) es su principal blanco en el ambiente natural. Diferentes factores, como la existencia de receptores para el virus en la superficie de la membrana celular, diferencias en la capacidad de sustentar procesos virales como entrada, replicación, síntesis de proteínas, entre otras, pudieran favorecer la replicación de astrovirus en el epitelio intestinal de su célula huésped.

Para elucidar la etapa del ciclo de replicación de HAstV que define su tropismo hacia las diferentes células estudiadas, evaluamos la capacidad de los virus para

unirse a la superficie celular y para replicarse en un paso posterior a la unión, que incluiría la internalización de la partícula viral y su replicación al interior de la célula.

El reconocimiento del receptor celular por parte del virus juega un papel crucial en la infección viral, ya que es la primer interacción entre el virus y la célula hospedera y define si una célula es susceptible o no (Flint y col., 2015). Existen reportes de otros virus, como dengue, en el que observaron que el nivel de unión a células varía ampliamente entre serotipos debido a diferencias estructurales en el dominio II de la proteína E de la envoltura (Diamond y col., 2000, Bielefeldt-Ohmann y col., 2001). Para determinar si esta interacción temprana es importante en el grado de infectividad de astrovirus, se determinó la unión viral en las células estudiadas. Los resultados obtenidos mostraron en primera instancia que, del total de virus añadido a las células, sólo se une entre el 1% y el 4%, lo cual es similar a reportes previos para otros virus, como rotavirus (Salgado y col., 2017). No está clara la razón de la baja unión del virus, pero puede deberse a la presencia de un número alto de partículas defectuosas en el lisado viral, o bien a una baja afinidad de la partícula viral por el receptor celular, o a una combinación de ambas. Por otro lado, encontramos que los virus se unieron más eficientemente a células Caco-2, sin embargo, esta unión es únicamente de 1 a 5 veces mayor que para las otras células (Fig. 13). Esto sugiere que la unión a la superficie celular no es el factor principal, o cuando menos no el único, que limita el tropismo viral y al mismo tiempo indica que hay pasos posteriores a la unión al receptor que acotan la replicación de los tres serotipos de HAstV. Esto se vio reflejado en el hecho de que cuando calculamos el número de virus que se producen en cada célula individual de las diferentes líneas celulares y para los diferentes serotipos, encontramos también una diferencia (Tabla 3). Así, las células Caco-2 produjeron entre 35 y 45 veces más HAstV-1 que MA104 y Vero; entre 7 y 17 veces más para HAstV-2 y; 19 veces más que MA104. También produjeron 134 veces que Vero, en el caso del serotipo 8.

En conjunto, los resultados anteriores indican que tanto el reconocimiento de receptores en la célula, como factores intracelulares, promueven de manera diferencial la infección viral. Ejemplo de este comportamiento es el caso de hepatitis C en el que se ha observado una diferencia en la permisividad en algunas líneas celulares derivadas de hepatoma debido a la ineficiencia de llevar a cabo procesos de replicación, secreción y otros factores celulares como la expresión de receptores en su superficie (Coto-Llerena y col., 2017). Se ha reportado que la replicación de HAstV-1 es sensible a interferón, por lo que es posible que factores asociados con la respuesta inmune innata interfieran con la infectividad de astrovirus en las diferentes líneas celulares (Guix y col., 2015; Marvin y col., 2015).

Sorpresivamente, se observó que a pesar de que astrovirus no infecta a células MDCK II, sí es capaz de unirse a ellas, incluso de manera similar a Vero y MA104 (Fig. 13). Esto habla de que posiblemente esta línea exprese las moléculas necesarias para el reconocimiento viral en su superficie, pero no presente las condiciones para la entrada del virus o los requerimientos intracelulares necesarios para montar una infección, tal como es el caso de coxackievirus B3 que puede reconocer su receptor viral en células CHO pero no puede ser internalizado exitosamente (Kramer y col., 1997).

Se ha propuesto que el dominio de espícula de HAstV reconoce el receptor viral en la célula blanco (Bogdanoff y col., 2017; Krishna, 2005). Para ahondar en las interacciones tempranas que influyen en la infectividad de astrovirus, realizamos ensayos de *far western* para detectar posibles receptores para el virus. Para esto utilizamos las espículas de los tres serotipos de astrovirus producidos en bacteria, las cuales conservan su estructura y función originales (Bogdanoff y col., 2017). En diversos virus se han utilizado técnicas análogas, como VOPBA (Virus Overlay Protein Binding Assay), con la diferencia de que en ésta se utilizan virus completos en lugar de proteínas específicas recombinantes de la cápside para la identificación de receptores virales (Jindadamrongwech y Smith, 2004). Por medio de esta técnica se identificó el papel de la subunidad β de la ATP sintasa como

receptor para el virus chikungunya (Fongsaran y col., 2014), o en el caso de dengue, en el que se logró identificar a HSP90 en células de neuroblastoma (Reyes-Del Valle y col., 2005), GRP 78 en hepatocitos (Jindadamrongwech y col., 2004) y al receptor de laminina LAMRI en fibroblastos de riñón (Tio y col., 2005) como receptores celulares.

En nuestro caso pudimos detectar proteínas específicas reconocidas por las espículas de los tres serotipos. Este patrón parece ser muy similar entre los serotipos 1 y 8, sobre todo por la presencia de dos bandas de alrededor de 65-75 kDa, lo que sugiere la existencia de receptores compartidos entre estos dos serotipos. La identificación de estas bandas por espectrometría de masas arrojó un total de 23 proteínas de membrana plasmática celular, de las cuales 5 se han reportado previamente como receptores para virus (Tabla 5). Por medio de análisis cristalográficos de la espícula de astrovirus se ha predicho que el receptor celular para éste pudiera ser un glicano (Dong y col., 2011). En el caso de las proteínas antes mencionadas que se han reportado como receptores virales, tres de ellas son glicoproteínas (la proteína receptora de transferrina, SCARB1 y SCARB2), sin embargo es necesario realizar análisis más profundos para determinar si algunas de estas proteínas interviene en el reconocimiento de astrovirus a la célula huésped. Esto pudiera realizarse inicialmente mediante RNAi utilizando siRNAs específicos para los genes de interés o interrumpiendo el gen que codifica por la proteína de interés por CRISPR/Cas.

Sorprendentemente, también se observaron proteínas reconocidas por las espículas de los tres serotipos de HAstV en la línea celular MDCK II, lo cual corrobora la capacidad de astrovirus para unirse a este tipo celular visto en nuestro ensayo de unión.

Existen numerosos estudios que comprueban la importancia de las proteínas involucradas en las uniones estrechas (TJ) en la infección de un gran número de virus, tanto en procesos de entrada, como el caso de adenovirus (Kotha y col., 2015), coxsacievirus B (Coyne y Bergelson, 2006) y rotavirus (Torres-Flores y col., 2015), como de propagación, en adenovirus (Walters y col., 2002) y West Nile

(Roe y col., 2012). Algo que es común entre todos ellos es que de una forma u otra los virus aprovechan este tipo de interacciones para aumentar o facilitar su infección a la célula blanco. En este trabajo nos encontramos el caso contrario, en el que la ausencia de una proteína de uniones estrechas (JAM-A) acentúa la infectividad de HAstV, fenómeno que no ha sido reportado previamente y que abre un panorama diferente en el estudio de esta interacción. Las proteínas de la familia JAM juegan un papel importante en la estabilización de las uniones estrechas, por lo que al no expresarse pudieran permitir el acceso de astrovirus a proteínas presentes en la zona basolateral que puedan ser importantes para facilitar la infección viral, probablemente a nivel de unión o entrada, como en el caso de ocludina, componente de TJ para rotavirus (Realpe y col., 2010), o algunas integrinas, como en el caso de adenovirus (Wickham y col., 1993). Sin embargo se requieren experimentos adicionales para entender el fenómeno observado de aumento de la infectividad viral en ausencia de JAM.

Por otro lado, se ha predicho por medio del análisis de la secuencia de aminoácidos y la estructura cristalográfica de la cápside de astrovirus, que la proteína VP25 (misma que forma parte de las espículas de astrovirus), pudiera no formar parte del virión maduro al perder la zona de interacción con el core viral durante la digestión con tripsina (Dong y col., 2011). Por otro lado, en estudios previos se mapeó el sitio de corte en el N terminal de VP27 (Gln-394) en el virión maduro, y los estudios cristalográficos sugieren que esta proteína debe ser capaz de permanecer asociada al core viral a través de una cadena principal formada por puentes de hidrógeno en la última hebra β situada en el dominio P1 (core). En cambio, el sitio de corte en el N-terminal de VP25 (Ser-424) está situado en el sitio de conexión entre los dominios P1 (core) y P2 (espícula), de modo que la única posibilidad en que VP25 se encuentre unida al virión maduro es formando dímeros con VP27 (Dong y col., 2011, Arias y DuBois, 2017).

Mediante el seguimiento de VP25 durante la purificación de partículas virales infecciosas (digeridas con tripsina) comprobamos que ésta se va perdiendo en cada uno de los pasos, resultando finalmente en un virión con prácticamente sólo

VP27, además de que la poca VP25 que aún queda puede ser eliminada eficientemente con un segundo tratamiento con la enzima sin afectarse la infectividad viral. Esto sugiere que VP25 es una proteína dispensable para la entrada e infección viral.

Este trabajo reporta un acercamiento al estudio de las primeras interacciones virus-célula y la diferencia de infectividad entre los diversos serotipos de astrovirus causantes de gastroenteritis en humanos. Esta información puede ser importante para desarrollar métodos de prevención y tratamiento de la enfermedad causada por estos virus.

CONCLUSIONES

- HAstV-8 infecta 1000 veces más a la línea celular Caco-2 que a Vero y MA104, mientras que para HAstV-1 y -2 ésta diferencia es de 100 veces.
- El tropismo de HAstV en células Caco-2, MA104 y Vero está dado por la unión del virus a las células, en combinación con factores que restringen o favorecen la replicación viral en etapas de la replicación viral posteriores a la unión.
- HAstV 1, 2 y 8 puede unirse a células MDCK II pero no son capaces de establecer una infección. Esto sugiere la existencia de un co-receptor que permite la entrada del virus a las células permisivas.
- Una molécula de aproximadamente 65-75 kDa pudiera funcionar como receptor para los HAstV de serotipos 1 y 8.
- VP25 no es esencial para que las partículas virales de HAstV-8 sean infecciosas.
- La proteína celular de uniones estrechas JAM-A, restringe la infección por los astrovirus humanos de los serotipos 1, 2 y 8.

PERSPECTIVAS

- Determinar si la entrada de astrovirus es diferencial entre líneas celulares y serotipos. Para ello podemos “saltarnos” el paso de entrada transfectando el RNA viral, puesto que este es capaz de iniciar un ciclo infeccioso una vez dentro de la célula.
- Determinar si astrovirus es capaz de establecer una infección en células MDCK II una vez dentro de la célula mediante la transfección de RNA viral.
- Identificar posibles receptores celulares para los serotipos 1, 2 y 8 de astrovirus humano empleando técnicas alternativas, como la co-precipitación de la molécula celular con la espícula viral.
- Caracterizar el papel de la proteína de uniones estrechas JAM-A en la restricción de la infección por HAstV.
- Caracterizar los factores celulares que limitan la replicación de HAstV en células parcialmente permisivas (MA104 y Vero). Una opción interesante a estudiar inicialmente como factor negativo es la respuesta inmune innata de estas células contra HAstV.

REFERENCIAS

1. Arias CF, DuBois RM. The Astrovirus Capsid: A Review. *Viruses*. 2017 Jan 19;9(1).
2. Barton ES, Forrest JC, Connolly JL, Chappell JD, Liu Y, Schnell FJ, Nusrat A, Parkos CA, Dermody TS. Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell*. 2001 Feb 9;104(3):441-51.
3. Bass DM, Upadhyayula U. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. *J Virol*. 1997 Nov;71(11):8666-71.
4. Bass DM, Qiu S. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. *J Virol*. 2000 Feb;74(4):1810-4.
5. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 1997 Feb 28;275(5304):1320-3.
6. Bielefeldt-Ohmann H, Meyer M, Fitzpatrick DR, Mackenzie JS. Dengue virus binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains. *Virus Res*. 2001 Jan;73(1):81-9.
7. Bogdanoff WA, Campos J, Perez EI, Yin L, Alexander DL, DuBois RM. Structure of a Human Astrovirus Capsid-Antibody Complex and Mechanistic Insights into Virus Neutralization. *J Virol*. 2017 Jan 3;91(2).
8. Bosch A, Pintó RM, Guix S. Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Oct;27(4):1048-74.
9. Brierley I, Vidakovic M. Ribosomal frameshifting in astroviruses. *Perspectives in Medical Virology. Viral Gastroenteritis*, vol. 9. Amsterdam: Elsevier; 2003:587–606.
10. Brinker JP, Blacklow NR, Herrmann JE. Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines. *Arch Virol*. 2000;145(9):1847-56.
11. Chikhi-Brachet R, Bon F, Toubiana L, Pothier P, Nicolas JC, Flahault A, Kohli E. Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France. *J Clin Microbiol*. 2002 Nov;40(11):4266-72.

12. Coto-Llerena M, Koutsoudakis G, Boix L, López-Oliva JM, Caro-Pérez N, Fernández-Carrillo C, González P, Gastaminza P, Bruix J, Fornis X, Pérez-Del-Pulgar S. Permissiveness of human hepatocellular carcinoma cell lines for hepatitis C virus entry and replication. *Virus Res.* 2017 Jul 24;240:35-46.
13. Coyne CB, Bergelson JM. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell.* 2006 Jan 13;124(1):119-31
14. Coyne CB, Bergelson JM. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell.* 2006 Jan 13;124(1):119-31.
15. Cunliffe NA, Dove W, Gondwe JS, Thindwa BD, Greensill J, Holmes JL, Bresee JS, Monroe SS, Glass RI, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. Detection and characterisation of human astroviruses in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol.* 2002 Aug;67(4):563-6.
16. Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol.* 2000 Sep;74(17):7814-23.
17. Dong J, Dong L, Méndez E, Tao Y. Crystal structure of the human astrovirus capsid spike. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Aug 2;108(31):12681-6.
18. Dryden KA, Tihova M, Nowotny N, Matsui SM, Mendez E, Yeager M. Immature and mature human astrovirus: structure, conformational changes, and similarities to hepatitis E virus. *J Mol Biol.* 2012 Oct 5;422(5):650-8.
19. Edmondson DG, Roth SY. Identification of protein interactions by far Western analysis. *Curr Protoc Mol Biol.* 2001 Aug;Chapter 20:Unit 20.6.
20. Fanning AS, Anderson JM. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 May;1165:113-20.
21. Flint Jane, Racaniello Vincent R., Rall Glenn F., Skalka Anna-marie, Enquist Lynn W. *Principles of Virology: Molecular Biology: 1. 4th ed.* ASM Press 2015; 31-32.

22. Fongsaran C, Jirakanwisal K, Kuadkitkan A, Wikan N, Wintachai P, Thepparit C, Ubol S, Phaonakrop N, Roytrakul S, Smith DR. Involvement of ATP synthase β subunit in chikungunya virus entry into insect cells. *Arch Virol*. 2014 Dec;159(12):3353-64.
23. Fuentes C, Bosch A, Pintó RM, Guix S. Identification of human astrovirus genome-linked protein (VPg) essential for virus infectivity. *J Virol*. 2012 Sep;86(18):10070-8.
24. Geigenmüller U, Ginzton NH, Matsui SM. Construction of a genome-length cDNA clone for human astrovirus serotype 1 and synthesis of infectious RNA transcripts. *J Virol*. 1997 Feb;71(2):1713-7
25. Golebiewski L, Liu H, Javier RT, Rice AP. The avian influenza virus NS1 ESEV PDZ binding motif associates with Dlg1 and Scribble to disrupt cellular tight junctions. *J Virol*. 2011 Oct;85(20):10639-48.
26. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*. 2003 Jan;81(1):1-44.
27. Gualtero DF, Guzmán F, Acosta O, Guerrero CA. Amino acid domains 280-297 of VP6 and 531-554 of VP4 are implicated in heat shock cognate protein hsc70-mediated rotavirus infection. *Arch Virol*. 2007;152(12):2183-96.
28. Guerrero ML, Noel JS, Mitchell DK, Calva JJ, Morrow AL, Martínez J, Rosales G, Velázquez FR, Monroe SS, Glass RI, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Pediatr Infect Dis J*. 1998 Aug;17(8):723-7.
29. Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolomé R, Latorre C, Rabella N, Simó M, Bosch A, Pintó RM. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol*. 2002 Jan;40(1):133-9.
30. Guix S, Pérez-Bosque A, Miró L, Moretó M, Bosch A, Pintó RM. Type I interferon response is delayed in human astrovirus infections. *PLoS One*. 2015 Apr 2;10(4).
31. Jeong HS, Jeong A, Cheon DS. Epidemiology of astrovirus infection in children. *Korean J Pediatr*. 2012 Mar;55(3):77-82.

32. Jindadamrongwech S, Smith DR. Virus Overlay Protein Binding Assay (VOPBA) reveals serotype specific heterogeneity of dengue virus binding proteins on HepG2 human liver cells. *Intervirology*. 2004;47(6):370-3.
33. Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol*. 2004 May;149(5):915-27.
34. Kotha PL, Sharma P, Kolawole AO, Yan R, Alghamri MS, Brockman TL, Gomez-Cambronero J, Excoffon KJ. Adenovirus entry from the apical surface of polarized epithelia is facilitated by the host innate immune response. *PLoS Pathog*. 2015 Mar 13;11(3):e1004696.
35. Kramer B, Huber M, Kern C, Klingel K, Kandolf R, Selinka HC. Chinese hamster ovary cells are non-permissive towards infection with coxsackievirus B3 despite functional virus-receptor interactions. *Virus Res*. 1997 May;48(2):149-56.
36. Krishna NK. Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology. *Viral Immunol*. 2005;18(1):17-26.
37. Londrigan SL, Hewish MJ, Thomson MJ, Sanders GM, Mustafa H, Coulson BS. Growth of rotaviruses in continuous human and monkey cell lines that vary in their expression of integrins. *J Gen Virol*. 2000 Sep;81(Pt 9):2203-13.
38. Lulla V, Kim DY, Frolova EI, Frolov I. The amino-terminal domain of alphavirus capsid protein is dispensable for viral particle assembly but regulates RNA encapsidation through cooperative functions of its subdomains. *J Virol*. 2013 Nov;87(22):12003-19.
39. Makino A, Shimojima M, Miyazawa T, Kato K, Tohya Y, Akashi H. Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J Virol*. 2006 May;80(9):4482-90.
40. Mandell KJ, Parkos CA. The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005 Apr 25;57(6):857-67.
41. Marin M, Tailor CS, Nouri A, Kabat D. Sodium-dependent neutral amino acid transporter type 1 is an auxiliary receptor for baboon endogenous retrovirus. *J Virol*. 2000 Sep;74(17):8085-93.

42. Martin DN, Uprichard SL. Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jun 25;110(26):10777-82.
43. Marvin SA, Huerta CT, Sharp B, Freiden P, Cline TD, Schultz-Cherry S. Type I Interferon Response Limits Astrovirus Replication and Protects against Increased Barrier Permeability In Vitro and In Vivo. *J Virol*. 2015 Dec 9;90(4)
44. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 30;101(13):4620-4.
45. Méndez E, Aguirre-Crespo G, Zavala G, Arias CF. Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis. *J Virol*. 2007 Oct;81(19):10649-58.
46. Mendez E, Arias CF. Astroviruses, *In* Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (6ed), *Fields virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2013 p 609–628.
47. Méndez E, Fernández-Luna T, López S, Méndez-Toss M, Arias CF. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J Virol*. 2002 Aug;76(16):7996-8002.
48. Méndez E, Muñoz-Yañez C, Sánchez-San Martín C, Aguirre-Crespo G, Baños-Lara Mdel R, Gutierrez M, Espinosa R, Acevedo Y, Arias CF, López S. Characterization of human astrovirus cell entry. *J Virol*. 2014 Mar;88(5):2452-60.
49. Méndez E, Salas-Ocampo MP, Munguía ME, Arias CF. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. *J Virol*. 2003 Nov;77(21):11378-84.
50. Méndez-Toss M, Griffin DD, Calva J, Contreras JF, Puerto FI, Mota F, Guiscafré H, Cedillo R, Muñoz O, Herrera I, López S, Arias CF. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. *J Clin Microbiol*. 2004 Jan;42(1):151-7.

51. Quan PL, Wagner TA, Briese T, Torgerson TR, Hornig M, Tashmukhamedova A, Firth C, Palacios G, Baisre-De-Leon A, Paddock CD, Hutchison SK, Egholm M, Zaki SR, Goldman JE, Ochs HD, Lipkin WI. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerg Infect Dis.* 2010 Jun;16(6):918-25.
52. Radoshitzky SR, Abraham J, Spiropoulou CF, Kuhn JH, Nguyen D, Li W, Nagel J, Schmidt PJ, Nunberg JH, Andrews NC, Farzan M, Choe H. Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature.* 2007 Mar 1;446(7131):92-6.
53. Rasko JE, Battini JL, Gottschalk RJ, Mazo I, Miller AD. The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 2;96(5):2129-34.
54. Realpe M, Espinosa R, López S, Arias CF. Rotaviruses require basolateral molecules for efficient infection of polarized MDCKII cells. *Virus Res.* 2010 Feb;147(2):231-41.
55. Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol.* 2005 Apr;79(8):4557-67.
56. Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol.* 2005 Apr;79(8):4557-67.
57. Roe K, Kumar M, Lum S, Orillo B, Nerurkar VR, Verma S. West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *J Gen Virol.* 2012 Jun;93(Pt 6):1193-203.
58. Salgado Eric N, Upadhyayula Srigokul, Harrison Stephen C. Single-Particle Detection of Transcription following Rotavirus Entry. *J Virol.* 2017 Sep 15; 91(18).
59. Sanchez-Fauquier A, Carrascosa AL, Carrascosa JL, Otero A, Glass RI, Lopez JA, San Martin C, Melero JA. Characterization of a human astrovirus

- serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. *Virology*. 1994 Jun;201(2):312-20.
60. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J*. 2002 Oct 1;21(19):5017-25.
61. Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, Saitou M, Tsukita S, Fromm M. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta*. 2005 May 15;1669(1):34-42.
62. Severson EA, Parkos CA. Structural determinants of Junctional Adhesion Molecule A (JAM-A) function and mechanisms of intracellular signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Oct;21(5):701-7.
63. Teoh KT, Siu YL, Chan WL, Schlüter MA, Liu CJ, Peiris JS, Bruzzone R, Margolis B, Nal B. The SARS coronavirus E protein interacts with PALS1 and alters tight junction formation and epithelial morphogenesis. *Mol Biol Cell*. 2010 Nov 15;21(22):3838-52.
64. Tio PH, Jong WW, Cardoso MJ. Two dimensional VOPBA reveals laminin receptor (LAMR1) interaction with dengue virus serotypes 1, 2 and 3. *Virology*. 2005 Mar 25;2:25.
65. Toh Y, Harper J, Dryden KA, Yeager M, Arias CF, Méndez E, Tao YJ. Crystal Structure of the Human Astrovirus Capsid Protein. *J Virol*. 2016 Sep 29;90(20):9008-17.
66. Torres-Flores JM, Arias CF. Tight Junctions Go Viral! *Viruses*. 2015 Sep 23;7(9):5145-54.
67. Torres-Flores JM, Silva-Ayala D, Espinoza MA, López S, Arias CF. The tight junction protein JAM-A functions as coreceptor for rotavirus entry into MA104 cells. *Virology*. 2015 Jan 15;475:172-8.
68. Torres-Flores JM, Silva-Ayala D, Espinoza MA, López S, Arias CF. The tight junction protein JAM-A functions as coreceptor for rotavirus entry into MA104 cells. *Virology*. 2015 Jan 15;475:172-8.

69. Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A, Tsukita S. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene*. 2008 Nov 24;27(55):6930-8.
70. Van Itallie CM, Fanning AS, Bridges A, Anderson JM. ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol Biol Cell*. 2009 Sep;20(17):3930-40.
71. Von Hahn T, Rice CM. Hepatitis C virus entry. *J Biol Chem*. 2008 Feb 15;283(7):3689-93.
72. Vu DL, Bosch A, Pintó RM, Guix S. Epidemiology of Classic and Novel Human Astrovirus: Gastroenteritis and Beyond. *Viruses*. 2017 Feb 18;9(2).
73. Vu DL, Cordey S, Brito F, Kaiser L. Novel human astroviruses: Novel human diseases? *J Clin Virol*. 2016 Sep;82:56-63.
74. Walter JE, Mitchell DK. Astrovirus infection in children. *Curr Opin Infect Dis*. 2003 Jun;16(3):247-53.
75. Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, Ganske I, Zabner J, Welsh MJ. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell*. 2002 Sep 20;110(6):789-99.
76. White LJ, Ball JM, Hardy ME, Tanaka TN, Kitamoto N, Estes MK. Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. *J Virol*. 1996 Oct;70(10):6589-97.
77. Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*. 1993 Apr 23;73(2):309-19.
78. Wu Y, Li Q, Chen XZ. Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nat Protoc*. 2007;2(12):3278-84.
79. Yamayoshi S1, Yamashita Y, Li J, Hanagata N, Minowa T, Takemura T, Koike S. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med*. 2009 Jul;15(7):798-801.
80. York RL, Yousefi PA, Bogdanoff W, Haile S, Tripathi S, DuBois RM. Structural, Mechanistic, and Antigenic Characterization of the Human Astrovirus Capsid. *J Virol*. 2015 Dec 9;90(5):2254-63.

81. Yu AS, McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE. Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Jun;288(6).
82. Yu D, Turner JR. Stimulus-induced reorganization of tight junction structure: the role of membrane traffic. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Mar;1778(3):709-16.
83. Zhu ZB, Makhija SK, Lu B, Wang M, Rivera AA, Preuss M, Zhou F, Siegal GP, Alvarez RD, Curiel DT. Transport across a polarized monolayer of Caco-2 cells by transferrin receptor-mediated adenovirus transcytosis. *Virology*. 2004 Jul 20;325(1):116-28.
84. Zihni C, Balda MS, Matter K. Signalling at tight junctions during epithelial differentiation and microbial pathogenesis. *J Cell Sci*. 2014 Aug 15;127(Pt 16):3401-13.
85. Guerrero CA, Bouyssounade D, Zárata S, et al. Heat Shock Cognate Protein 70 Is Involved in Rotavirus Cell Entry. *Journal of Virology*. 2002;76(8):4096-4102.