

# ACTUALIZACIÓN

## UN MODELO DEL MECANISMO DE ENTRADA DE LOS ROTAVIRUS A LA CÉLULA HOSPEDERA

A model for the mechanism of entry of rotaviruses into the host cell

Orlando Acosta L<sup>1</sup>, Martha N. Calderón<sup>2</sup>, Liz P. Moreno<sup>3</sup>,  
Carlos A. Guerrero<sup>4</sup>

1. BSc., MSc., PhD. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
2. BSc., Estudiante de Doctorado, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
3. Agr. MSc., PhD., Sección de Fisiología y Producción de Cultivos, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
4. MD., MSc., PhD. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Correspondencia: oacostal@unal.edu.co

### Resumen

**Antecedentes.** La infección rotaviral es causa principal de gastroenteritis aguda severa en niños menores de cinco años. La capa protéica externa de la partícula viral está implicada en las interacciones iniciales virus-superficie celular. El mecanismo rotaviral de unión y entrada a la célula parece ser un proceso de múltiples pasos donde las proteínas rotavirales VP4 y VP7 interactúan con diferentes moléculas de la superficie celular.

**Objetivo.** Proponer un mecanismo de entrada de rotavirus a la célula que incorpore la actividad de la proteína disulfuro isomerasa (PDI).

**Material y métodos.** Utilizando bases de datos electrónicas, se realizó una búsqueda de literatura original y de revisión publicada entre 1990 y 2009 sobre moléculas de la superficie rotaviral o celular participantes en el proceso de entrada del virus. El análisis de los resultados enfatizó las bases moleculares y celulares de las interacciones temporales-espaciales de las proteínas virales y las moléculas de unión/receptoras de la célula.

**Resultados.** Se encontró fundamentos moleculares y celulares para incorporar la actividad de PDI a un mecanismo coherente de vías secuenciales o alternativas previas a la penetración viral.

Se propone un mecanismo en que interactúan las proteínas virales VP4, VP6 y VP7 con las moléculas de la superficie celular ácido siálico, integrinas, Hsc70 y PDI en un proceso endocítico caveola/"raft"-dependiente, caveolina/clatrina-independiente, dinamina-dependiente y sensible a depleción de colesterol.

**Conclusión.** Se amplía el concepto de múltiples pasos en el proceso de entrada de rotavirus, donde la participación de PDI podría ser un blanco potencial de la acción de inhibidores de grupos tiol/disulfuro.

**Palabras clave:** rotavirus, integrinas, proteína de choque térmico, disulfuros, isomerasas.

**Acosta O, Calderón MN, Moreno LP, Guerrero CA.** Un modelo del mecanismo de entrada de los rotavirus a la célula hospedera. *Rev.Fac.Med.* 2009; 57: 124-148.

### Summary

**Background.** Rotavirus infection is the leading single cause of severe acute gastroenteritis in children under five years of age. The outermost layer of the triple-layered protein capsid of the non-enveloped virus particle has been involved in initial interactions between virus and host cell surface. The rotavirus mechanism for cell attachment and entry seems to be a multistep process in which outermost layer virus proteins VP4 and VP7 interact with different cell surface molecules.

**Objective.** To propose a mechanism for rotavirus entry to the host cell incorporating the protein disulfide isomerase (PDI) activity.

**Materials and methods.** A systematic search for original and review literature published from 1990 to 2009 on rotavirus and cell surface molecules participating in virus entry process was conducted through the use of electronic Databases. The analysis of the published results emphasized the molecular and cellular bases of time and

space interactions between virus proteins and cell surface attachment and receptor molecules.

**Results.** We found molecular and cellular bases for incorporating PDI within a coherent mechanism involving sequential or alternative paths previous to virus penetration. A mechanism is proposed in which virus proteins VP4, VP6 and VP7, and cell surface sialic acid, integrins, Hsc70, and PDI interact as part of a caveola/raft-mediated endocytic process that is characterized by its caveolin and clathrin independence, dynamin dependence, and sensitivity to cholesterol depletion.

**Conclusions.** The rotavirus entry mechanism appears to be a complex multistep process in which the path using PDI could be a potential target for antiviral agents reacting with thiol/disulfide groups.

**Key words:** rotavirus, integrins, heat-shock cognate protein 70, disulfides, isomerases.

**Acosta O, Calderón MN, Moreno LP, Guerrero CA.** A model for the mechanism of entry of rotaviruses into the host cell. *Rev.Fac.Med.* 2009; 57: 124-148.

### Introducción

En muchas partes del mundo los rotavirus constituyen la primera causa de gastroenteritis aguda en niños menores de cinco años. La deshidratación ocasionada por el evento diarreico es la causa más significativa de muerte en los infantes de países en desarrollo, donde se produce más del 80 por ciento de las muertes estimadas anualmente en cerca de 600.000 a nivel mundial (1,2). La infección rotaviral tiene costos sociales muy elevados para los gobiernos y las familias, la mayoría de ellos representados en costos médicos directos (3). Recientemente se han introducido dos vacunas (RotaTeq, Rotarix) que han sido bien toleradas y han mostrado una buena eficacia en la protección de los infantes (2, 4). Sin embargo, el desarrollo de estas vacunas (virus vivos atenuados) ha suscitado algunos interrogantes sobre su costo, eficacia, seguridad (5) y riesgos de transmisión (6).

Los rotavirus, pertenecientes a la familia *Reoviridae*, están constituidos por partículas carentes de cubierta lipídica, las cuales contienen un genoma de dsRNA distribuido en 11 segmentos.

Las proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) de la partícula viral se disponen en tres capas concéntricas. La capa más interna está constituida por la proteína VP2 y contiene además el genoma y las proteínas VP1 y VP3. La VP6, la más abundante e inmunogénica, conforma la segunda capa del virión. Las proteínas de la cápside más externa corresponden a las proteínas de superficie VP7 y VP4, las cuales contienen los determinantes del tipo G (glicoproteína) y del tipo P (proteasa), respectivamente y ambas son el blanco de la acción de anticuerpos neutralizantes. La VP4 es fragmentada por la tripsina para producir las proteínas VP5\* y VP8\* (7, 8, 9, 10). Las partículas virales



con las tres capas proteicas concéntricas (TLPs) son infecciosas, mientras que aquellas no infecciosas poseen sólo dos capas (DLPs). El presente artículo se centra en la consideración de las interacciones entre las moléculas receptoras de la superficie de las células MA104 y las proteínas estructurales de partícula rotaviral, aportando como nuevo componente del mecanismo de entrada de este virus la actividad de óxido-reducción (redox) de la proteína disulfuro isomerasa (PDI). Aunque el mecanismo molecular aquí propuesto recoge resultados previos de varios laboratorios, se destaca la participación de la actividad redox, se sugiere la existencia de posibles vías alternativas para la entrada de los rotavirus y se enfatiza la posibilidad de la utilización de agentes antivirales interferentes del intercambio de los grupos tiol-disulfuro durante la etapa más temprana del proceso de infección.

### Material y métodos

Se realizó una búsqueda sistemática de la literatura original y de revisión publicada entre 1990 y 2009 sobre las moléculas rotavirales y de la superficie de la célula hospedera participantes en el proceso de entrada de los rotavirus. Se tuvo acceso a las bases de datos Science Direct, Jstor, Ebsco, Medline, Pubmed, utilizando las palabras claves “rotavirus entry”, “rotavirus integrins”, “rotavirus hsc70”, “virus entry protein disulfuro isomerase”, “integrin disulfide”, “rotavirus VP6”, “rotavirus DLP”. Los criterios de inclusión en la búsqueda de literatura fueron los siguientes: que la literatura estuviera comprendida entre 1990 y 2009; que el aspecto central de la literatura estuviera representado por los receptores o moléculas de superficie de la célula o por las proteínas de superficie de la partícula viral que toman parte en la interacción virus-célula durante el proceso de entrada del virus a la célula hospedera; o que la literatura in-

cluyera propuestas de modelos sobre el mecanismo de entrada del rotavirus a la célula hospedera. Las palabras claves utilizadas produjeron 207 artículos, de los cuales 98 cumplieron con los criterios de inclusión. Se citó un total de 142 artículos, incluyendo 44 referidos a los aspectos básicos del rotavirus y célula. La unidad de análisis de la literatura se delimitó especialmente a las interacciones virus-célula en el contexto del proceso de entrada del rotavirus. Se destacaron los resultados que permitieran dar un fundamento celular y molecular a la propuesta de un mecanismo coherente de entrada del rotavirus, en el cual se pudiera enfatizar la noción secuencial, simultánea o alternativa de las interacciones virus-célula, previas a la penetración del virus.

El modelo original de mecanismo aquí propuesto sobre la entrada de rotavirus a la célula hospedera tendrá como insumos los resultados contenidos en la literatura original seleccionada de acuerdo con los criterios de inclusión antes referidos. Estos resultados originales serán resumidos en la subsiguiente sección, en donde se hace evidente la ausencia de la consideración de la actividad redox de PDI en el mecanismo de entrada de los rotavirus, ausencia que amerita la formulación de un nuevo modelo de mecanismo de entrada, en el cual la PDI se constituye en un elemento central de este nuevo modelo.

### Resultados

#### Fundamentos del mecanismo de entrada

**Entrada de virus a la célula.** El ciclo de infección viral incluye varias etapas, entre las cuales el evento de entrada a la célula constituye la primera de ellas. Como vías generales de entrada de los virus a la célula se han descrito la endocítica y la no-endocítica (11). La primera de estas vías implica transporte en vesículas

cubiertas por clatrina o a través de micropinocitosis y caveolas (12), aunque otros virus utilizan vías independientes de clatrina (13,14) o promueven su internalización al inducir la polimerización local de actina y agrupamiento de dinamina en el sitio de entrada (13,15).

La segunda vía comprende el paso a través de la membrana mediante fusión de membranas, un evento típico de los virus con cubierta lipídica, el cual también puede ser utilizado en la vía endocítica. El proceso de entrada también implica cambios conformacionales en las proteínas estructurales del virus o en las proteínas receptoras de superficie de la célula, así como la desestabilización o remoción gradual de las proteínas de la cubierta de la partícula (13). La entrada de algunos virus puede ser intensificada por microdominios lipídicos ("rafts") (16). Otros virus pueden entrar a las células a través de contacto célula-célula (17) y algunos pueden entrar y salir de las células a través del proceso conocido como transitos (18), el cual implica un transporte vesicular de partículas virales desde un lado a otro de la célula. Las proteínas de la superficie de las partículas virales determinan la utilización específica de receptores y el rango de hospedero del virus. Por lo tanto, la identificación de las vías de entrada de los virus a la célula no solo es importante para el entendimiento de los mecanismos de patogénesis, sino para el desarrollo de estrategias terapéuticas de interferencia de la infección viral. En consecuencia, los mecanismos de entrada de los virus a la célula se han constituido en un objeto central de investigación básica con amplias perspectivas de aplicación terapéutica (19).

**Células hospederas de rotavirus y moléculas receptoras.** Las células hospederas principales de los rotavirus son los enterocitos diferenciados maduros de las vellosidades del epitelio intestinal, aunque se puede presentar escape viral desde

el tracto gastrointestinal y producirse viremia con detección de virus en órganos extra-intestinales tales como hígado, bazo, pulmón, riñón, páncreas, timo, vejiga y sangre (20,21,22). *In vitro*, los rotavirus parecen tener un rango de tejidos relativamente amplio, dado que células de origen renal e intestinal, o líneas celulares transformadas derivadas de seno, estómago, hueso y pulmón son susceptibles a la infección rotaviral (23). La entrada de los rotavirus a sus células hospederas utiliza receptores de la superficie celular, los cuales incluyen ácido siálico (SA), integrinas, hsc70 y PDI (24,25,26). Estos receptores parecen ser utilizados en una forma secuencial para asegurar una infección exitosa.

**Glicoconjugados.** El tropismo de los rotavirus se atribuye a la presencia de receptores en la superficie celular a los cuales se unirían las partículas virales. Se han propuesto como receptores rotavirales glicoconjugados (glicoproteínas y glicoesfingolípidos) (27 - 33), en los cuales se ha destacado la unidad de ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico (SA) (34). Relativamente pocos rotavirus animales requieren la presencia de SA sobre la superficie de la membrana celular, mientras que la mayoría son independientes de SA (35), dado que el proceso infeccioso no se interfiere después de la remoción del SA con la enzima neuraminidasa (NA).

Sin embargo, estudios de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) sugieren que el SA es un elemento clave en la unión de rotavirus tanto sensibles o insensibles al tratamiento con NA (34). La unión de los rotavirus al SA tiene lugar a través de los aminoácidos 93 a 208 de VP8\* (36). Algunos autores han considerado que la unión a SA no es esencial, debido a que mutantes independientes de SA derivados de cepas dependientes de SA son capaces de unirse eficientemente a la superficie celular y de producir infección (35,37). Por lo tanto, estos



autores proponen que en la superficie celular existe un receptor para las cepas de rotavirus independientes de SA, el cual también es utilizado por las cepas de rotavirus dependientes de SA en un segundo evento después de su unión a SA. Ambos tipos de cepas utilizan a VP5\* para su unión a este receptor (9,38).

**Integrinas.** Las integrinas son receptores transmembranales de la superficie celular, conformados por proteínas heterodiméricas (subunidades a y b) ricas en cisteína. Cada subunidad presenta un dominio extracelular relativamente grande, un dominio transmembranal y una cola citoplasmática corta (39). La unión de virus o proteínas de la matriz extracelular (ECM) induce agrupamiento y cambios conformacionales en la estructura cuaternaria de las integrinas. Las integrinas han sido implicadas en los eventos de unión, post-unión y entrada de rotavirus durante el proceso de infección. Entre estas integrinas se encuentran  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha x\beta 2$ ,  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha 4\beta 7$  (23, 40 - 44), las cuales se han identificado como participantes en la unión y entrada de los rotavirus del grupo A a la célula (40-42). Sin embargo, se han reportado cepas rotavirales que no requieren de integrinas para infectar la célula hospedera (45). Las integrinas actúan como receptores de señalización bidireccionales, pero también actúan como receptores o co-receptores celulares de varios virus, tales como ecovirus (46), virus coxacki (47), virus de la fiebre aftosa (48), adenovirus (49) y papilomavirus (50).

La proteína VP4 (VP5\*) de rotavirus contiene la secuencia DGE en la posición 308-310 (43, 40,51), la cual es reconocida por la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , mientras que la secuencia IDA (aa 538-540) parece representar un sitio potencial de unión para la integrina  $\alpha 4\beta 1$ . Sin embargo, la integrina  $\alpha 2\beta 1$  en sí misma no es responsable de la unión inicial a la célula en el caso de los

rotavirus dependientes de SA. Es así como la cepa rotaviral nar3, una mutante independiente de SA, se une a la célula a través de  $\alpha 2\beta 1$ , mientras que la cepa RRV se une a esta integrina en un evento posterior a su unión a SA (37,38). Las integrinas  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 7$  también se han reportado como mediadores de la unión y la infectividad de algunos rotavirus, siendo VP4 (VP5\*) responsable de la unión a  $\alpha 4\beta 1$  a través de la secuencia YGL (44), y VP7 a través de las secuencias potenciales LDV o LDI (40,44).

Por otra parte, la proteína VP7 contiene la secuencia GPR en los aminoácidos 253-255, conformando el ligando de la integrina  $\alpha x\beta 2$  (40, 42). Se ha podido concluir que  $\alpha x\beta 2$  estaría implicada en un evento posterior a la unión del virión a la célula (45). VP7 participa en un evento de post-unión de acuerdo con la inhibición de la infección producida por anticuerpos dirigidos contra esta proteína estructural (52) y la inhibición obtenida con los péptidos GPR. Además, VP7 también interacciona con  $\alpha v\beta 3$  en una etapa de post-unión, facilitando así la entrada del virus y la infección (45). Anticuerpos contra las subunidades  $\alpha v$  y  $\beta 3$  de integrina y vitronectina (ligando de  $\alpha v\beta 3$ ) bloquean la infectividad de la cepa RRV dependiente de SA, de la mutante independiente de SA (nar3) y de la cepa humana Wa resistente a NA (41).

Sin embargo, no se ha reportado en VP4 o VP7 el motivo RGD, característico de las proteínas que se unen a la integrina  $\alpha v\beta 3$ . La comparación de secuencias de las proteínas de superficie de rotavirus y hantavirus condujo a establecer que estos virus interactúan con la integrina  $\alpha v\beta 3$  a través de una secuencia compartida que para el caso de VP7 corresponde a 161NEWLCNPMD169, denominada CNP y altamente conservada en la mayoría de las cepas rotavirales secuenciadas. Un péptido sintético que incluía esta secuencia fue capaz de inhibir

la infección con las cepas RRV y nar3, sin alterar la unión del virus a la célula, indicando que la interacción VP7- $\alpha$ v $\beta$ 3 ocurre en un paso posterior a la unión del virus a la célula (41,45).

**Proteína de choque térmico Hsc70.** La proteína Hsc70 (heat shock cognate protein 70) es la forma constitutiva de Hsp70, una familia de proteínas inducidas por choque térmico. Hsc70 consiste de dos dominios comunicados alostéricamente (53): un dominio ATPasa N-terminal y otro dominio C-terminal que une como sustrato las cadenas polipeptídicas extendidas (54). Las funciones de la familia Hsp70 son amplias en los procesos de plegamiento y el desplegamiento de los polipéptidos durante la traslocación o después de la desagregación, durante el ensamblaje y el desensamblaje de los complejos de las proteínas y en la señalización de choque térmico (55).

Típicamente los miembros de la familia Hsp70 se localizan en el nucleocitoplasma, pero algunas de estas proteínas se han encontrado en la superficie celular (56). Específicamente, Hsc70 se ha detectado en la superficie de las células MA104 y Caco-2 y su implicación en el proceso de entrada de los rotavirus se ha evidenciado mediante la inhibición de la infección producida por anticuerpos anti-Hsc70 (57). La interacción entre la partícula viral y la Hsc70 ocurre en un evento subsiguiente a la unión del virus a la célula y es un evento compartido por las cepas rotavirales sensibles y resistentes a la NA (57). La interacción entre el rotavirus RRV y la Hsc70 implica una secuencia de amino ácidos comprendida entre las posiciones 642 y 649 de VP5\* (58). Sin embargo, en la cepa rotaviral CRW8 esta interacción parece implicar la secuencia 650-657 de la proteína VP5\* (32). La interacción del rotavirus y Hsc70 en solución parece inducir cambios conformacionales en las proteínas de superfi-

cie del virus (59). Recientemente se ha sugerido que Hsc70 interacciona durante el proceso de entrada de los rotavirus con VP6 y VP4 (VP5\*) a través las secuencias amino acídicas 280-297 y 531-554, respectivamente (60).

Estos hallazgos también sugirieron la participación de las DLPs durante el proceso de entrada debido a que la adición de estas partículas virales purificadas o de péptidos sintéticos comprendiendo estas secuencias inhibió la infección de células MA104 y Caco-2. La posible implicación de la VP6 de las DLPs tanto *in vivo* como *in vitro* también ha sido propuesta durante el proceso de entrada de los rotavirus a partir de los resultados obtenidos con fragmentos de anticuerpos de cadena simple (VHH) derivados de llama y dirigidos contra la conformación nativa de la VP6 en la partícula viral (61).

**Proteína disulfuro isomerasa (PDI).** Las tiol isomerasas conforman una familia de enzimas localizadas en el retículo endoplásmico (ER) que incluyen, entre otras, la PDI, ERp5, ERp57 y ERp72. Estas enzimas catalizan reducción, oxidación y rearrreglos de las cadenas polipeptídicas naciendo asegurando así la correcta formación de los enlaces disulfuro (62). Sin embargo, se ha demostrado que estas enzimas no se encuentran confinadas al ER, sino que también están presentes en la superficie celular, confiriéndole a las proteínas presentes en la superficie diferentes estados conformacionales y funcionales (63). La PDI de la superficie celular hace parte a su vez de una familia de enzimas de mamífero denominada genéricamente como familia de las proteínas disulfuro isomerasa (PDI), las cuales comparten características estructurales y de secuencia y la capacidad de catalizar la formación de enlaces disulfuro, su reducción o intercambio; Además de esta actividad redox y de isomerasa, estas enzimas poseen actividad de chaperona (64,65).



La familia de las enzimas PDI pertenece a la superfamilia de enzimas tioredoxina, la cual incluye las tioredoxinas y las glutaredoxinas humanas (64). Las PDIs poseen uno o más dominios relacionados con la tioredoxina del citoplasma, presentando al menos un dominio que contiene la actividad redox alojada en el tetrapéptido CXXC (65). La PDI de la superficie celular es secretada por varios tipos de células, asociándose luego a la superficie celular mediante interacciones electrostáticas o a través de otras proteínas (67, 68, 69). PDI se desprende fácilmente de la membrana celular y es rápidamente remplazada por nuevas moléculas provenientes del interior de la célula (70). La PDI asociada a la membrana celular se ha encontrado en varios tipos de células tales como células endoteliales, hepatocitos, células pancreáticas, linfocitos, plaquetas y células cancerosas (63,71).

Se ha demostrado que la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  específica de la superficie celular de plaquetas posee actividad endógena de tiol isomerasa en ensayos libres de células. Esta actividad se deriva de la presencia del motivo tetrapeptídico CXXC en cada una de las repeticiones ricas en cisteínas de los polipéptidos  $\beta\text{3}$  (72). Este motivo comprende el sitio activo de enzimas implicadas en reacciones de intercambio tiol-disulfuro, las cuales incluyen la PDI y las tioredoxinas. Actividad intrínseca tiol isomerasa también se ha encontrado en la integrina  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ , la cual comparte la subunidad común  $\beta\text{3}$  (72). Las integrinas  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  y  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$  se han identificado como sustratos de PDI de la superficie celular (71,73).

La PDI de la superficie celular de plaquetas regula su agregación y adhesión dependiente de integrinas (73,74), lo que ha conducido a sugerir que su mecanismo implica las cisteínas extracelulares de la subunidad  $\beta$  de las integrinas. Se ha demostrado que la exposición

de células endoteliales a iones de  $\text{Mn}^{++}$  induce la aparición de grupos tiol en la membrana celular, los cuales pueden ser encontrados en PDI y en la integrina  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ , co-localizadas en la superficie celular. Además, la exposición a este ion induce la formación de complejos estequiométricos de PDI/ $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  (75). La actividad regulatoria de la PDI en el complejo con  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  induce la conversión de la integrina a su estado de alta afinidad competente para unir ligandos. Varias observaciones indican que la unión del ligando a integrinas induce cambios conformacionales asociados a intercambio de enlaces disulfuro dentro de la integrina (76).

La PDI de la superficie celular ha sido implicada en la reducción de los enlaces disulfuro del heterodímero de la toxina diftérica (77) y en el desencadenamiento de la entrada del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) a las células linfoides (78). Otros miembros de la superfamilia de proteínas tioredoxina, como la glutatioredoxina-1, han sido sugeridos como participantes en la reacción redox asociada a la entrada de este virus (79,80). En el proceso de entrada del HIV a las células linfoides humanas se ha encontrado que la PDI de la superficie celular se une al receptor CD4 en la proximidad del sitio de unión de la glicoproteína gp120 de la cubierta lipídica del virus, facilitando así la reducción de enlaces disulfuro de gp120 (78,81).

Con relación al ensamblaje de los rotavirus, la VP7 es una glicoproteína residente del ER con una orientación luminal necesaria para el ensamblaje sobre la superficie de las DLPs. Se ha encontrado que la PDI interacciona con la VP7 glicosilada para asegurar la formación y el plegamiento correctos de la VP7 en el ER, y consecuentemente la ocurrencia del ensamblaje viral (82). El silenciamiento de la expresión de chaperonas del ER, entre ellas la PDI, interfiere la formación o el rearrreglo de los en-



laces disulfuro de la VP7 y la formación de TLPs (83). Se ha demostrado que la interferencia en la formación de los puentes de disulfuro en la VP7 afecta la formación de partículas virales infecciosas debido al bloqueo en el ensamblaje de la capa más externa del virion (84).

Hallazgos previos relacionados con proteínas de membrana con potencialidad de interacción con rotavirus sugirieron la participación de la PDI en el proceso de infección (85). Recientemente se reportó la inhibición de la infección rotaviral mediante el tratamiento previo de células MA104 con inhibidores del intercambio tiol-disulfuro tales como bacitracina y DTNB [5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)]. Dado que estos inhibidores no son transportados a través de la membrana celular, se sugirió la participación de la PDI de la superficie celular en el proceso de entrada de los rotavirus (26). Ensayos de biotilación con reactivos que no permean la membrana celular y análisis de citometría de flujo (FACS) confirmaron la presencia de PDI en la superficie de la célula. La especificidad del bloqueo de la infección con bacitracina y DTNB se confirmó con la adición de anticuerpos anti-PDI o de péptidos sintéticos correspondientes a VP4 y VP7 que contenían cisteínas en su secuencia, los cuales inhibieron significativamente la infección con rotavirus RRV (26).

El análisis de co-inmunoprecipitación sugirió que PDI se encuentra asociada en "rafts" con Hsc70 y  $\alpha v\beta 3$ , mientras que un ensayo de unión indicó que la interferencia de la infección con inhibidores del intercambio tiol-disulfuro o con anticuerpos anti-PDI no afecta la unión de las partículas virales a la superficie celular, sugiriendo la participación de PDI (o de otra actividad enzimática similar) en un evento de post-unión durante la entrada del rotavirus (26). En estos estudios también se demostró *in vitro* la interacción directa entre de PDI y TLPs, la cual

se vio interferida por inhibidores de grupos tiol (bacitracina).

**Microdominios lipídicos.** Los "rafts" son operacionalmente definidos como microdominios de membrana celular resistentes a detergente y enriquecidos en colesterol y glico-esfingolípidos, dentro de los cuales se concentran proteínas asociadas. Existe evidencia de la heterogeneidad de los "rafts", los cuales tienen diferencias en composición lipídica, protéica, en funciones y en propiedades físicas (86,87,88). Se asume que los "rafts" funcionan como plataformas para el anclaje de proteínas de señalización y receptores, y además para la recepción de virus con envoltura o sin envoltura lipídica (16, 89,90). Se ha sugerido que microdominios lipídicos de membranas ricas en esfingolípidos y colesterol podrían estar implicados en la entrada de los rotavirus (41,91 - 93). La unión de los rotavirus a la célula parece depender de gangliósidos como se ha deducido del bloqueo parcial de la infectividad producido por inhibidores de la síntesis de glicolípidos (29). Recientemente se ha demostrado la participación del colesterol en el ensamblaje de las partículas rotavirales en células tratadas con lovastatina (94).

**Cambios conformacionales.** Cambios conformacionales en las proteínas estructurales de virus con cubierta lipídica o sin ella se han encontrado asociados a los eventos de entrada del virus a la célula. En virus con cubierta lipídica, como en el caso de HIV se ha demostrado que las proteínas gp120 y gp141 de la cubierta sufren cambios conformacionales mayores durante el proceso de entrada (95). Se han reportado cambios conformacionales en la proteína de las espículas de coronavirus debidos al contacto con sus receptores (96), o en las glicoproteínas de la cubierta lipídica de la partícula viral de ortomixovirus y paramixovirus debidos a la reducción de enlaces disulfuro (97). Reacciones redox, la acción de proteasas o variaciones de



pH también han sido reconocidas como causas de la inducción de cambios conformacionales en las proteínas de fusión de virus con cubierta lipídica (98 - 100).

En el caso de virus carentes de cubierta lipídica, tales como adenovirus, reovirus, virus adenoasociados y poliovirus, también se ha evidenciado cambios conformacionales durante la interacción con sus receptores celulares (101-104). Cambios conformacionales se ha demostrado en rotavirus como consecuencia del clivaje de VP4 con tripsina (7,20,105). En el modelo de múltiples pasos propuesto para rotavirus se ha sugerido cambios conformacionales en las proteínas de la partícula viral durante los eventos de unión y post-unión (105). Esta hipótesis se ha visto fortalecida por los estudios cristalográficos de un fragmento de VP5\*, los cuales indican que esta proteína modifica su estructura al retraerse sobre sí misma, pasando de una estructura dimérica a una trimérica, para permitir su interacción con la membrana celular a través de la exposición de un dominio hidrofóbico (106, 107). Experimentos en solución conducidos para esclarecer la interacción de Hsc70 con las proteínas de la cápside externa del rotavirus, permitieron sugerir la ocurrencia de cambios conformacionales detectables producidos en las proteínas virales como consecuencia del contacto con esta chaperona (59,105).

#### **Aproximaciones al proceso de entrada de múltiples pasos**

Aunque se han propuesto varias moléculas receptoras para los rotavirus, permanece en medio de controversia el mecanismo por medio del cual entran los rotavirus a la célula (93,105,91).

El primer contacto del rotavirus con la superficie celular implica la participación de moléculas sensibles o resistentes a neuraminidasa, depen-

diendo de la cepa viral. Se han propuesto entre estas moléculas de la célula a los gangliosidos GM1 y GM3, y la integrina  $\alpha 2\beta 1$  (9,30,45). Independientemente de la molécula utilizada para la unión inicial a la célula, los rotavirus después de interactuar con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  utilizan la integrina  $\alpha v\beta 3$  y la proteína hsc70 como receptores de post-unión (41,57), así como la integrina  $\alpha x\beta 2$  (40,41). La proteína VP4 es responsable por la unión inicial del virus a la célula (108) y también por los eventos de post-unión que implican a  $\alpha 2\beta 1$  (23) y hsc70 (58), mientras que la VP7 interacciona con las integrinas  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha x\beta 2$  en una etapa de post-unión (45).

#### **Penetración del rotavirus a la célula**

El proceso de entrada de los virus a la célula hospedera termina finalmente con la penetración de la partícula viral al interior de la célula. Se ha sugerido que el rotavirus podría penetrar directamente o por endocitosis mediada por receptor (109,110). Tratamientos interferentes de la endocitosis mediada por clatrina o caveolina no tuvieron efecto sobre la infección con rotavirus, mientras que ésta fue inhibida por el secuestro del colesterol de la membrana o por la expresión de un mutante dominante negativo para dinamina, una GTPasa implicada en la escisión de las vesículas formadas de novo (25, 111). La dinamina se organiza en estructuras tubulares ordenadas helicoidalmente, las cuales se constriñen por la adición de GTP, conduciendo a su vez a la constricción de los cuellos de las invaginaciones de la membrana y a la fisión (excisión) de las vesículas (112,113).

Las caveolas son pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática, de 50-100 nm de diámetro, estabilizadas por caveolina asociada a ciertos microdominios lipídicos (“rafts”) ricos en colesterol y esfingolípidos. Sin embargo, se ha sustentado que las caveolas y los “rafts” son

internalizados como parte de una vía endocítica común denominada endocitosis dependiente de caveola/raft, caracterizada por su independencia de clatrina, dependencia de dinamina y sensibilidad a la depleción de colesterol (114,115). Se debe destacar que aún en la ausencia de caveolina, la internalización de “rafts” involucra la invaginación y la gemación de estructuras vesiculares ricas en colesterol y esfingolípidos (114). Se ha documentado endocitosis dependiente de caveola/raft e independiente de la expresión de caveolina (116-118). Es posible la existencia de múltiples vías endocíticas dependientes de caveola/raft y variadas formas de reclutar ligandos y receptores para posibilitar el ingreso endocítico de ligandos o virus (13,114). Recientemente se ha propuesto un mecanismo de entrada de rotavirus que implica endocitosis dependiente de caveola/raft, independiente de clatrina y caveolina, dependiente de dinamina y sensible a la depleción de colesterol (105,114, 115).

Tanto el mecanismo de penetración directa o el mediado por endocitosis, implican que las partículas virales infecciosas (TLPs) deben despojarse durante el proceso de entrada de las proteínas de la capa externa para generar las DLPs transcripcionalmente activas. Se ha sugerido que las concentraciones diferenciales de  $Ca^{++}$  en el medio intracelular y extracelular podrían desencadenar el evento de generación de DLPs (119, 120). Estas concentraciones diferenciales de  $Ca^{++}$  y los efectos experimentales *in vitro* de  $Ca^{++}$  sobre VP7 han conducido a concluir que tanto la formación de la capa mas externa de la partícula viral como su remoción durante el proceso de entrada se encuentran mediadas por cambios conformacionales en VP7 dependientes de  $Ca^{++}$  (121). La interferencia de la infección mediante el tratamiento con bafilomicina A1, un inhibidor de la ATPasa de la bomba vacuolar de protones y la capacidad de la proteína soluble de la superficie del rotavirus para permeabilizar la membra-

na, han conducido a proponer que la entrada de los rotavirus implica un mecanismo endocítico sensible a las concentraciones de  $Ca^{++}$  y dependiente de clatrina (122).

En este mecanismo endocítico la partícula se ubicaría en el endosoma donde las proteínas de la cápside externa serían solubilizadas como consecuencia de la disminución de la concentración de  $Ca^{++}$  ocasionada por la ATPasa de la bomba vacuolar de protones. La acidificación producida en el endosoma por esta ATPasa se encuentra acoplada a la pérdida de concentraciones de  $Ca^{++}$  en el endosoma (123). La permeabilización de la membrana endosomal facilitaría la liberación de las DLPs en el citoplasma (122,124). Sin embargo, en este modelo se han resaltado algunos aspectos en conflicto relacionados con la endocitosis dependiente de clatrina, dado que la interferencia del ensamblaje de clatrina no afecta la infección de rotavirus (105,111). Además, se ha encontrado que la bafilomicina A1 no solo inhibe la ATPasa de la bomba de protones, sino que también afecta otras funciones celulares utilizadas por virus (105,125).

### Construcción del modelo del mecanismo de entrada

El mecanismo de entrada de los rotavirus a la célula hospedera parece estar compuesto por múltiples interacciones que ocurren entre las proteínas estructurales del virión y moléculas receptoras de la superficie celular (24,25,105). Los hallazgos experimentales indican que al menos tres de las interacciones virus-célula tienen lugar en un orden secuencial (126), en el cual cepas dependientes de SA como RRV se unen inicialmente a la unidad de SA antes de su unión a la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , mientras que cepas independientes de SA, como la mutante nar3 de RRV, se unen directamente a  $\alpha 2\beta 1$  (9,37). El análisis de unión y post-unión para los rotavirus



**Tabla 1.** Moléculas de la superficie celular y proteínas virales implicadas en el proceso de entrada de rotavirus

Molécula de Superficie	Proteína de la partícula viral	Etapas del proceso de entrada	Estructura de la partícula viral	Referencias
SA/gangliósido	VP4(VP8*)	Unión	TLP	(30,33-36)
$\alpha 2\beta 1$	VP4(VP5*)	Unión/postunión	TLP	(37,38)
$\alpha 4\beta 1$	VP4(VP5*)	Postunión	TLP	(40,44)
$\alpha 4\beta 7$	VP4(VP5*)/VP7	Postunión	TLP	(40,44)
$\alpha x\beta 2$	VP7	Postunión	TLP	(40,42,45,52)
$\alpha v\beta 3^\ddagger$	VP7	Postunión	TLP	(41,45)
Hsc70	VP4(VP5*)/VP6	Postunión	TLP/DLP	(32,57-60)
PDI	VP4/VP7	Postunión	TLP	(26)

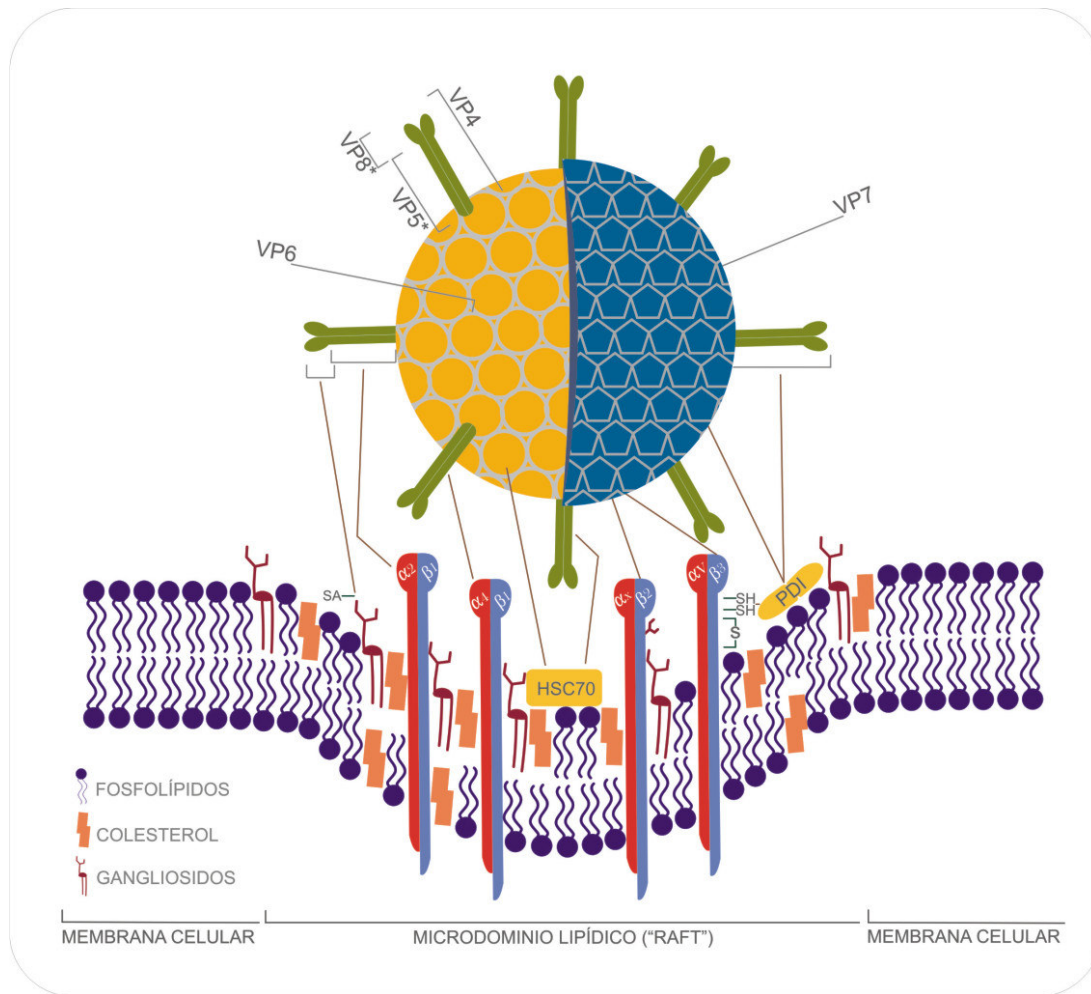
<sup>‡</sup>  $\alpha v\beta 3$  es un sustrato potencial de PDI.

RRV, nar3, Wa y SA11 reveló que estas cepas interactúan con las integrinas  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha x\beta 2$  y  $\alpha v\beta 3$  después de su unión a  $\alpha 2\beta 1$  (41,45), de acuerdo con el bloqueo de la infección producido por anticuerpos dirigidos contra las integrinas  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha x\beta 2$  y  $\alpha v\beta 3$ , o por ligandos específicos de esta última, sin afectarse la unión del virus a la célula. Los estudios de la implicación de la Hsc70 en la entrada de los rotavirus, utilizando metodologías similares a las citadas para las integrinas, han conducido a conclusiones similares en términos de su participación en un evento de post-unión necesario para el proceso de infección mas no para el evento de unión inicial a la célula (57,58,60).

La participación de la PDI de la membrana celular en un evento de post-unión (26) estaría añadiendo otra molécula al catalogo de moléculas previamente reportadas como implicadas en el proceso de entrada de los rotavirus (25,105). Adicionalmente, la Hsc70 de la superficie celular estaría extendiendo su participación al interactuar con VP4, a través de un nuevo motivo, y con VP6 cuando ésta hace parte de DLPs (60). Estos nuevos hallazgos conducirían a hacer más complejos los eventos de post-unión. A la utilización secuencial de SA y  $\alpha 2\beta 1$  seguiría la interacción de la partícula rotaviral con Hsc70, las integrinas  $\alpha x\beta 2$ ,  $\alpha v\beta 3$  (25,105) y

$\alpha 4\beta 1$  (44) y PDI (26) en un orden aun no establecido. Los contactos subsiguientes de la partícula viral con los receptores adicionales propuestos no se encuentran esclarecidos con relación a su posible orden secuencial, su utilización alternativa o su naturaleza molecular.

Después de la interacción del virus con SA y integrina  $\alpha 2\beta 1$ , las interacciones entre las proteínas estructurales del virion y los receptores celulares propuestos incluyen de una parte VP4, VP7 y VP6 (DLPs), y de otra parte Hsc70, PDI e integrinas  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha x\beta 2$  y  $\alpha v\beta 3$ . Adicionalmente, se ha evidenciado la co-immunoprecipitation de PDI, Hsc70, integrina  $\alpha v\beta 3$  y partículas rotavirales presentes en microdominios lipídicos (“rafts”) (23), en condiciones en las cuales el componente lipídico ha sido removido. Esta concurrencia o asociación en “rafts” sugiere la posibilidad de la interacción física y específica (directa o indirecta) proteína-proteína entre las proteínas del virion y los receptores celulares, así como de éstos entre sí. De hecho, se ha reportado que algunas integrinas son sustrato de la PDI de la superficie celular (71,73,75). Aunque la PDI clásica carece del dominio J, propio de algunas PDIs que reclutan y estimulan proteínas de la familia Hsp70 (65, 127), no se podría descartar que actividades de tiol isomerasa de la mem-



**Figura 1.** Interacciones entre proteínas de la partícula viral y moléculas de la superficie de la célula hospedera. De acuerdo con los resultados descritos en las secciones precedentes, se ilustra el catálogo de interacciones entre las proteínas virales VP4 (VP5\* y VP8\*), VP7 y VP6 (DLP) y las moléculas de la superficie celular ácido siálico (SA) (muy probablemente haciendo parte de un gangliosido) (30, 33), Hsc70, Integrinas ( $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha x\beta 2$  y  $\alpha x\beta 3$ ) (25, 44) y PDI (26). Se ilustra además la insinuación de una invaginación (caveola/"raft") en la membrana celular, la cual sería prerequisite para la unión del virus o, alternativamente, la unión del virus promovería su formación y el reclutamiento y/o disposición específica de al menos algunas de las proteínas receptoras asociadas al "raft". (Construcción colectiva de los autores con base en la literatura citada. Diseñador gráfico: Felipe Guaque).

brana distintas a la PDI pudieran actuar eventualmente sobre Hsc70. Con fundamento en la información antes referida, se amplía el modelo de trabajo sobre el mecanismo de entrada del rotavirus a la célula hospedera, en términos del número de moléculas participantes y sus interacciones, como se ilustra en la figura 1. Las interacciones entre las moléculas de la superficie celular y las proteínas de la partícula

viral son resumidas en la tabla 1. En el modelo aquí propuesto, las cepas rotavirales sensibles a NA se unirían inicialmente a un receptor que contiene la unidad de SA, para lo cual utilizarían el dominio VP8\* de VP4 cuyo sitio de unión se encuentra localizado en el extremo de las cabezas globulares diméricas de VP4 (128, 129). Este evento de unión inicial a SA puede ser omitido, como en el caso del mutante nar3, en el cual el



dominio de unión de VP8\* a SA ha sido afectado conformacionalmente por substitución de un aminoácido (130). En este caso, el virus transitaría directamente a un segundo receptor representado por la integrina  $\alpha 2\beta 1$  (9). Las cepas dependientes de SA experimentarían un cambio conformacional en VP4 como consecuencia de su interacción con SA a través del dominio VP8\*, lo que capacitaría a la partícula viral para interaccionar con el segundo receptor (integrina  $\alpha 2\beta 1$ ) a través del dominio VP5\* de VP4, de manera similar a como lo hacen las cepas naturalmente independientes de SA, las cuales se unen inicialmente a la célula a través de la interacción VP5\*- $\alpha 2\beta 1$ .

Sin embargo, modelos derivados de estudios cristalográficos de un fragmento de VP5\* (107) permiten sugerir que el clivaje de VP4 con tripsina sería determinante en generar cambios conformacionales que capacitarían los productos (VP8\* y VP5\*) de este clivaje para interaccionar con sus respectivos receptores. En estos mismos estudios, Dormitzer y colaboradores (107) introducen la hipótesis de un evento desconocido que propiciaría la dimerización de VP5\*, lo cual sería seguido por la trimerización de VP5\*, la liberación de VP8\* y el retro-plegamiento (“folding-back”) de VP5\*. Estos rearrreglos conformacionales transicionales se asemejarían a los presentados en las proteínas de fusión de membrana de los virus con cubierta lipídica. Se ha propuesto como hipótesis la participación de Hsc70 en los cambios conformacionales de la glicoproteína E de fusión de membrana del virus de la encefalitis japonesa (JEV), un virus con cubierta lipídica. La Hsc70 no sólo jugaría papel importante en anclar este virus a la membrana, sino que modificaría los cambios conformacionales de la transición de la forma dimérica a la forma trimérica de esta proteína (131). La hipótesis del funcionamiento de Hsc70 como un receptor de pene-

tración que media la entrada de JEV se ha visto soportada por los parches (regiones) hidrofóbicos presentes en Hsc70 que habilitarían su interacción con la membrana (131,132).

A partir de otros estudios se ha sugerido que VP5\* unida a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  podría adoptar un cambio conformacional asociado a su trimerización, proponiéndose la ocurrencia de cambios conformacionales y activación de esta integrina como requisitos previos a la unión de VP5\* (45, 51). De sucederse esta secuencia de eventos en condiciones *in vivo*, sería interesante considerar la posible participación de Hsc70 y PDI en los cambios conformacionales asociados a estos eventos asumidos como parte del mecanismo de desestabilización de la membrana de la célula hospedera. Y si la eventual participación de la actividad redox/chaperona sería concomitante con la interacción VP4 (VP5\*)- $\alpha 2\beta 1$  o posterior a ella. Como se señaló anteriormente,  $\alpha 2\beta 1$  es sustrato de la PDI de la superficie celular de plaquetas y su activación implica generación de de grupos tiol (71- 73).

Se ha reconocido que las chaperonas del tipo Hsp70/Hsc70 comúnmente interaccionan con regiones hidrofóbicas de proteínas para facilitar el desensamblaje de complejos de proteínas en una forma dependiente de ATP (133). Aunque Hsc70 interacciona con VP4 a través de los dominios aa 642-658 (58) y aa 531-554 (60), el dominio hidrofóbico potencialmente fusiogénico de VP5\* (aa 385-404) podría ser un sustrato potencial de Hsc70.

La interacción de Hsc70 con TLPs en solución parece producir cambios conformacionales en VP5\* y VP7, de acuerdo con la modificación de las reactividades de estas proteínas a anticuerpos monoclonales, y por los efectos diferenciales de la temperatura y el pH sobre la infectividad (59). Sería informativo determinar

si los efectos conformacionales de Hsc70 en solución sobre VP7 son directos o consecuenciales de la unión con VP4. En conjunto, las anteriores consideraciones conducen a formular la hipótesis de que la interacción post-unión del rotavirus con HSc70 facilitaría la generación de cambios conformacionales en VP5\* que le permitirían asumir su forma trimérica desestabilizadora de la membrana celular o de la vesícula endocítica. La presencia de VP4 en “rafts” de células Caco-2, donde participaría en los eventos finales de ensamblaje de la partícula viral (134) y la actividad lipofílica de VP5\* residente en su dominio hidrofóbico y causante de permeabilización en ensayos en membranas bacterianas (135), son indicativas de la afinidad de VP4 por la membrana celular y fortalecen la semejanza entre esta proteína y aquellas proteínas implicadas en la fusión de membrana de virus con cubierta lipídica (107). Además, VP7 es una proteína residente del ER con capacidad de desorganizar membranas (136).

La reversión, en alguna medida, del evento de ensamblaje de TLPs, podría proponerse dentro del mecanismo de entrada con respecto a la generación de DLPs a partir de la remoción de VP4. Esta remoción, y la de VP7, generaría una superficie hidrofóbica que facilitaría el proceso de entrada de las DLPs transcripcionalmente activas al citoplasma a través de la membrana celular o de la membrana de la vesícula endocítica, de manera similar a como las DLPs ensambladas en inclusiones citoplasmáticas son luego translocadas al ER, donde adquieren transitoriamente una cubierta lipídica (137).

El orden en el ensamblaje de VP4 y VP7 para generar TLPs a partir de DLPs (134) no parece coincidir con el orden de su remoción en el proceso de entrada (107). El orden y la localización del ensamblaje de VP4 *in vivo* continúan siendo objeto de controversia (138), aunque el or-

den que permite obtener un recubrimiento eficiente *in vitro* de las DLPs se encuentra a favor de la hipótesis de que *in vivo* VP4 precede la unión de VP7 (138).

La unión del virión a la superficie celular y los eventos de post-unión parecen implicar cambios conformacionales y eventos de óxido-reducción, los cuales podrían ser conseguidos con la contribución de las actividades de chaperona y redox/isomerasa presentes en Hsc70, PDI o aún en integrinas como  $\alpha\beta 3$  (actividad tiolisomerasa). Las dos proteínas de la cápside externa (VP4 y VP7) poseen enlaces disulfuro. VP4 de muchos rotavirus animales dependientes de SA contiene cinco cisteínas en las posiciones 203, 216, 318, 280 y 774. En particular, en la cepas simianas RRV y SA11 se han identificado dos enlaces disulfuro en VP4, uno en el dominio VP8\* (Cis-203/Cis-216) y otro en el dominio VP5\* (Cis-318/Cis-380) (139). En variantes de RRV independientes de SA se han podido determinar tres mutaciones puntuales en VP4, una de las cuales corresponde al cambio Tir→Cis en la posición 267.

En el caso de la variante gp18, la presencia de esta cisteína adicional permite la formación de un enlace disulfuro alternativo (Cis-267/Cis-318) en el dominio VP5\* de VP4 (92), el cual puede coexistir con el enlace disulfuro Cis-318/Cis-380. Se ha sugerido que la presencia de estos enlaces disulfuro en el dominio VP5\* de las variantes independientes de SA podría contribuir al aseguramiento de cambios conformacionales favorables para la interacción de esta proteína con el primer receptor (integrina  $\alpha 2\beta 1$ ) de la superficie celular para este tipo de cepas (92).

Con base en lo anterior, y en que PDI parece interactuar con VP4, de acuerdo con la interferencia de la infección producida por péptidos



sintéticos de VP4 potenciales substratos de PDI o por anticuerpos dirigidos contra estos péptidos (26), se podría especular que PDI estaría reduciendo los enlaces disulfuro de VP4 (VP8\* o VP5\*) o produciendo cambios conformacionales en esta proteína a través de su actividad de chaperona, con dos consecuencias: 1- promover la separación de VP8\*, y 2- disminuir la afinidad de VP5\* por la integrina  $\alpha 2\beta 1$  para contribuir a hacer irreversible la vía de entrada del virus. Como se indicó anteriormente, VP7 requiere la obtención de un estado oxidado (formación de enlaces disulfuro) para constituir partículas virales viables, de acuerdo con resultados derivados del tratamiento de células infectadas con agentes reductores (84).

Se asume que el enlace disulfuro (s) de VP7 juega un importante papel estructural y funcional en esta proteína, tanto para su ensamblaje como para su interacción con los receptores de la célula. Los enlaces disulfuro de VP7 estarían contribuyendo a la adecuada tridimensionalidad de dominios dependientes de conformación para la interacción con receptores (Hsc70, PDI, Integrinas). La interacción entre VP7 y PDI ha sido recientemente sugerida (26).

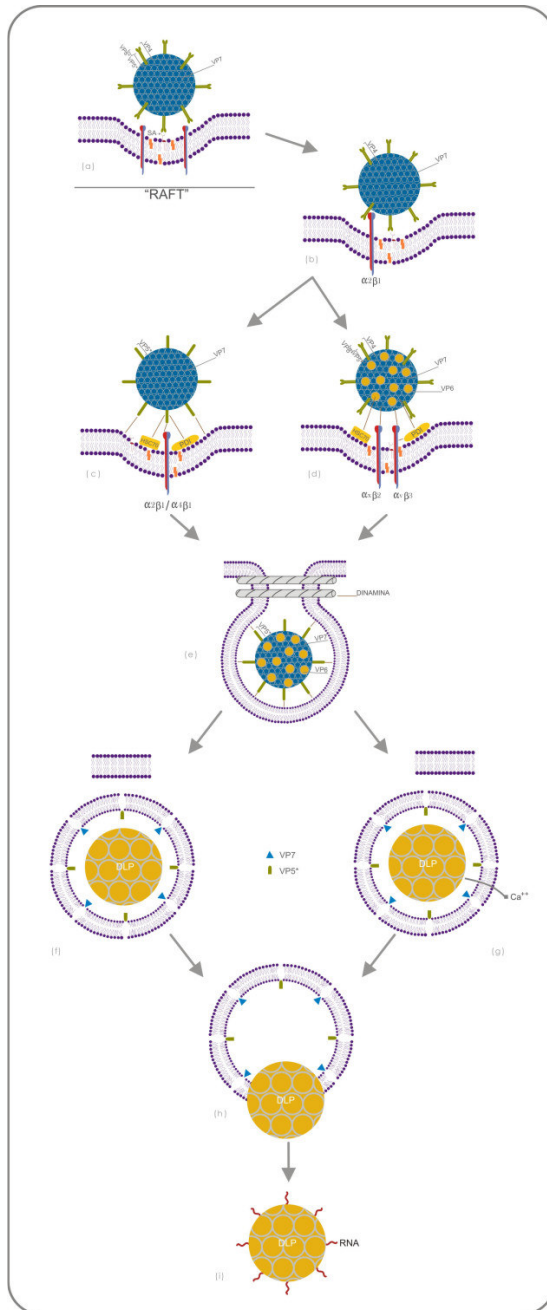
Por otra parte, la condición reducida de la VP7 del ER (136) parece ser desfavorecida para hacer parte de las TLPs maduras, lo que conduciría a suponer que la reducción de enlaces disulfuro de la VP7 de la partícula viral promovería su desprendimiento y aumentaría su afinidad por membranas o ambientes hidrofóbicos. Algunas de las regiones de las proteínas VP4 y VP7 que interactúan con los receptores han sido identificadas y no solo es posible que la secuencia primaria esté implicada en el reconocimiento sino también las características conformacionales y probablemente el enlace disulfuro, sustrato potencial de la actividad tiol-isomerasa de PDI.

La actividad redox de PDI, entendida en su concepto bidireccional, actuaría predominantemente como oxidante (formando enlaces disulfuro) en el ER para propiciar el estado conformacional adecuado de VP7 para la generación (ensamblaje) de TLPs intracelularmente. Por otra parte, el evento de entrada del rotavirus a la célula podría implicar en alguna medida la reversión del proceso de desensamblaje, bajo la consideración de que en la superficie celular PDI predomina con su capacidad reductora y que la posible generación de grupos tiol en VP7 y VP4 contribuiría al desensamblaje de las TLPs y a la capacitación de estas proteínas para su interacción secuencial con los receptores de la superficie celular.

El hallazgo en plaquetas que la integrina  $\beta 3$  es sustrato de PDI y que, de otra parte, se ha encontrado que estas dos proteínas están asociadas en “rafts” en las células MA104, permitiría proponer que PDI podría estar capacitando a la integrina (mediante la generación de grupos tiol) para interactuar con la partícula viral a través de VP7. No se podría excluir que alternativamente PDI con su actividad tiol-isomerasa o de chaperona pudiera estar capacitando a VP7, mediante reducción de enlaces disulfuro o mediante cambios conformacionales, respectivamente, para interactuar con integrinas ( $\alpha x\beta 2/\alpha v\beta 3$ ), o para su posible remoción antes de que VP4 clivada (VP8\* y VP5\*) se desprenda de VP6 (DLP) (107).

En cualquier caso, parece plausible que la interacción de VP7 con las integrinas tenga su mayor significado en eventos de señalización propios de la inducción de la internalización endocítica dependiente de receptor. En el caso de que la interacción inicial de PDI se realizara con VP4, se podría postular (además del posible efecto de disminución de su afinidad por la integrina  $\alpha 2\beta 1$ ) que una eventual reducción de





**Figura 2. Modelo del mecanismo de interacción del rotavirus con las moléculas de la superficie de la célula hospedera.** El proceso de entrada del rotavirus es descrito dentro del concepto de interacciones secuenciales virus-receptor (24,25), y como parte de un evento dependiente de un microdominio lipídico caveola/"raft", independiente de clatrina y caveolina, dependiente de dinamina y sensible a la depleción de colesterol. Los rotavirus dependientes de ácido siálico (SA) interaccionarían en un evento inicial de unión a través del dominio VP8\* de VP4 con un receptor que contiene SA (a) (muy probablemente un gangliosido) (30, 33). Esta interacción produciría un cambio conformacional en VP4, capacitándola para unirse al dominio I de la subunidad α de la integrina α2β1 (44, 45), a través del dominio VP5\* de VP4 (43, 51) (b). Las cepas independientes de SA se unirían directamente a α2β1. La unión de VP4 (VP5\*) a α4β1 ocurriría de manera subsecuente a la unión a α2β1. La secuencia de eventos subsiguiente no está aun establecida, pero algunos de los eventos probables son propuestos en el presente modelo. En un evento simultáneo o secuencial, VP4 (c) y VP7 (d) experimentarían cambios conformacionales previos a su interacción con la membrana celular y a su desprendimiento de la TLP. Hsc70 y PDI contribuirán a estos cambios conformacionales, facilitando que VP4 (VP5\*), una vez desprendido el dominio VP8\*, se asocie con la membrana celular (c). PDI con su actividad redox induciría a la integrina αvβ3 a un estado de alta afinidad por VP7 (d), y PDI, simultánea o alternativamente, con su actividad redox, de isomerasa o de chaperona produciría en VP7 rearrreglos conformacionales que permitirían la exposición de VP6 y su interacción con Hsc70 (60) (d). En una etapa subsiguiente, las proteínas VP4, VP7 y VP6 conformacionalmente modificadas, serían compartimentalizadas en una vesícula endocítica mediante la constricción o fisión producida por la dinamina (111) (e). Dentro de las vesículas internalizadas, las proteínas VP4 (VP5\*) y VP7 se separarían de la partícula viral para generar la DLP y para desestabilizar la membrana de la vesícula, siguiendo dos rutas alternativas o complementarias (f, g): estas proteínas se desprenderían de la partícula viral como consecuencia de los cambios conformacionales previos (f), o como consecuencia de la reducción de la concentración de Ca<sup>++</sup> en el interior de la vesícula (105, 122, 124), debida a la actividad de la ATPasa de la bomba vacuolar de protones (g). Las proteínas VP4 (VP5\*) y VP7 desestabilizarían la membrana de la vesícula (h) para facilitar la salida de la DLP al citoplasma en su condición transcripcionalmente activa (i). (Construcción colectiva de los autores con base en la literatura citada. Diseñador gráfico: Felipe Guaque).



su enlace disulfuro presente en el dominio VP5\* podría facilitar su interacción con Hsc70, la cual a su vez podría imprimirle cambios conformacionales adicionales necesarios para las subsiguientes interacciones del virus con otros receptores o para la desestabilización de la membrana. También cabe considerar el posible papel de PDI o Hsc70 en la facilitación del desprendimiento de VP4 (VP5\*) de VP6.

La participación de Hsc70 en la entrada de los rotavirus se vería aun más justificada teniendo en cuenta su interacción con VP6 (DLPs) (60), posiblemente en un evento de post-unión muy posterior, cuando el acceso a VP6 sea facilitado por cambios conformacionales ocurridos en VP7 o por el eventual desensamblaje de VP4 y VP7, o alternativamente, en un evento necesario para el desensamblaje al menos de VP4 de VP6 (DLP). No es claro en el momento si la liberación de VP4 de VP6 (DLPs) implica cambios conformacionales adicionales en VP4 o VP6, o en ambas proteínas y cuál sería el orden temporal de estos cambios, que finalmente generarían las DLPs transcripcionalmente activas.

Como parte del proceso endocítico, se debe asumir la necesidad de la insinuación de caveolas/rafts independientes de caveolina presentes previamente (prontamente o transitoriamente formadas) en la membrana plasmática para la unión inicial del virus. Esta unión del virus podría promover el reclutamiento de receptores adicionales o su asociación en el “raft” con una geometría particular dinámica coherente con potenciales eventos físicos y bioquímicos secuenciales o alternativos.

Se hace necesario entonces delimitar los eventos de interacción virus-célula que ocurrirían antes y después de la excisión (fisión) de la vesícula endocítica como consecuencia de la constricción producida por la dinamina. La afinidad

de VP5\* y de VP7 (en su estado reducido o conformacionalmente modificado) por membranas, podría dar lugar a la desestabilización de la membrana. Esta desestabilización podría tener lugar desde la condición de proteínas modificadas unidas, o liberadas de la DLP. Tal evento desestabilizador de la membrana podría ocurrir antes o después de la excisión de la vesícula endocítica.

Sin embargo, la sensibilidad del evento endocítico a las concentraciones de  $Ca^{++}$  y la capacidad de la proteína soluble de la superficie del virus para permeabilizar la membrana, hacen suponer que la disminución de  $Ca^{++}$  ocasionada por la ATPasa de la bomba vacuolar de protones podría contribuir a la liberación de las proteínas de superficie del virus y a la consecencial permeabilización de la membrana del endosoma y a la liberación de las DLPs en el citoplasma (122). No se podría excluir la ocurrencia alternativa o complementaria de ambos eventos de permeabilización de la membrana. Es probable que los cambios conformacionales ocurridos en las proteínas de la superficie viral ocasionados por sus interacciones con tripsina, Hsc70 y PDI sean suficientes para liberarlas de la superficie del virus y producir la permeabilización.

También es probable que la disminución de  $Ca^{++}$  en la vesícula endosomal haga más susceptibles las proteínas de superficie a la ocurrencia de cambios conformacionales, o que la disminución de este catión contribuya al desprendimiento y solubilización de las proteínas de superficie con cambios conformacionales previos.

En la Figura 2 (a-i) se ilustra un modelo de interacciones secuenciales o alternativas entre las proteínas virales y las moléculas de la superficie de la célula hospedera y que son compatibles con la argumentación descrita en el presente artículo.

## Discusión

El modelo de entrada del rotavirus a la célula propuesto en el presente artículo describe las posibles vías alternativas de entrada del rotavirus a la célula. En particular, se ha introducido la participación de la PDI y sus actividades redox y de chaperona, con fundamento en la inhibición de la infección mediante la adición de inhibidores del intercambio tiol-disulfuro y de anticuerpos anti-PDI. En nuestro modelo, consideramos como una alternativa en el proceso de entrada que la PDI puede actuar reduciendo receptores celulares y ligandos virales en el ambiente extracelular. Esta hipótesis permitiría explicar cambios conformacionales como consecuencia de la ruptura de enlaces disulfuro en proteínas estructurales del rotavirus, tales como VP4 y VP7, lo que podría capacitarlas para interacciones subsiguientes con receptores adicionales de la superficie celular.

Adicionalmente, la PDI podría ejercer su actividad redox reduciendo receptores celulares como las integrinas, particularmente la cadena  $\beta 3$ , sobre la cual se ha demostrado que es objeto de reducción por parte de la PDI en células endoteliales (75). La generación de grupos sulfidril (tiol) en la cadena  $\beta 3$  de la integrina la capacitaría para interactuar con ligandos virales (VP7) en el proceso conducente a la internalización del virus. El soporte experimental que permita decidir el orden secuencial de interacciones entre PDI, VP7 e integrina  $\alpha v \beta 3$  no se encuentra disponible, pero podría ser factible que PDI actuara sobre VP7 y  $\alpha v \beta 3$ , previo a la interacción virus-receptor.

La participación de la actividad redox cobraría importancia terapéutica en el marco de interferencia potencial del intercambio tiol-disulfuro con agentes antivirales que implicarían consecuentemente la interferencia de los cambios conformacionales requeridos en el proceso de

entrada de los rotavirus. Bajo la consideración de la presencia de enlaces disulfuro en la estructura tridimensional nativa de VP4 y VP7, y la interferencia de sus interacciones con PDI a través de la adición de péptidos sintéticos derivados de secuencias de estas proteínas virales, postulamos que los eventuales cambios conformacionales requeridos por estas proteínas virales podrían ser facilitados por la PDI con su actividad redox, sin excluir la participación de su actividad de chaperona y la contribución de Hsc70. La participación de Hsc70 de la superficie celular en su interacción con VP4 (VP5\*), y en la producción de cambios conformacionales en la partícula viral en solución (59), sugieren la implicación de la actividad de esta chaperona en la inducción de cambios conformacionales en el virion durante el proceso de entrada.

No hay evidencia experimental en el momento que sugiera el posible orden relativo de las interacciones entre el virus y los receptores celulares PDI y Hsc70. En este contexto, sería importante determinar experimentalmente si la interacción PDI-TLPs genera grupos sulfidril (tiol) en VP4 y VP7. En el momento, en nuestro laboratorio se adelanta experimentación tendiente a establecer si la participación de PDI en la entrada de rotavirus se sucede de manera directa sobre las proteínas virales o indirectamente a través del estado de óxido-reducción de las integrinas.

El hallazgo de la co-localización de PDI, Hsc70,  $\alpha v \beta 3$  (26) y partículas rotavirales (93) en microdominios lipídicos ("rafts"), también contribuye a dar soporte a la hipótesis de que la partícula rotaviral no necesita transitar un espacio de largo rango para llevar a cabo sus interacciones secuenciales a través de los diversos receptores celulares. De la misma manera, cualquier eventual interacción entre receptores se vería favorecida por la proximidad física. A las interacciones virus-receptor se le podría atribuir el concepto de



procesividad característico de las polimerasas, en el sentido de que el virus una vez unido al “raft” que contiene el complejo de receptores, procede en sus interacciones secuenciales hasta el final de todas ellas, previo a su proceso de penetración a la célula.

En los eventos de entrada del virus a la célula se hace necesario resolver experimentalmente la posibilidad de degeneración en el sentido de que una misma cepa viral pueda utilizar más de una vía para ingresar a la célula, o que necesariamente no deba transitar por todos los posibles contactos virus-receptor. La ausencia de interdependencia de las interacciones de VP4 y VP7 con las integrinas y el carácter aditivo del efecto sobre la infectividad ejercido por reactivos anti-integrina (45) sugieren la posibilidad de la existencia de vías alternativas de entrada para una misma cepa viral. En este caso, la infectividad máxima de un rotavirus se podría interpretar como el resultado de la sumatoria de la utilización de todas las vías alternativas de entrada a la célula, lo cual no excluiría que algunos pasos sean prerequisite de otros. La alta relación de partículas físicas/unidades infecciosas encontrada en rotavirus se ha interpretado parcialmente en términos de muchas partículas que tratan de entrar a la célula por vías que no tienen salida (138).

Esto también podría sugerir la existencia de vías alternativas o combinaciones de eventos secuenciales que no culminarían en la penetración exitosa del virus. La ocurrencia de una porción común entre vías alternativas para diferentes cepas rotavirales tampoco puede ser excluida, es decir, que diferentes cepas virales utilicen parcialmente vías diferenciales de entrada a una misma célula, o que dependiendo del tipo de célula, una cepa rotaviral pueda utilizar al menos parcialmente diferentes vías. Un examen experimental sistemático del posible carácter aditivo

(o no aditivo) del efecto sobre la infectividad viral de los inhibidores de los diferentes receptores podría aportar información sobre la factibilidad de vías alternativas en la entrada de los rotavirus.

La neutralización de la infección rotaviral exhibida por fragmentos recombinantes de anticuerpos (VHH) dirigidos contra VP6 (61), brinda soporte a la participación de VP6 en el proceso de entrada. Especialmente porque esta neutralización fue conseguida mediante pre-tratamiento de las partículas virales con los fragmentos VHH, seguido de incubación de las células con la mezcla rotavirus-VHH a 37 °C. Exceptuando que el efecto de los fragmentos VHH haya sido intracelular, parece que VP6 (DLPs) requiere exponerse durante el proceso de entrada, al menos como consecuencia de la remoción de VP7, para interactuar con moléculas receptoras de la superficie celular. La interacción de VP6 con Hsc70 y la inhibición de la infección mediante la adición de DLPs o de anticuerpos dirigidos contra un péptido sintético de VP6 (60) conducen a sugerir la participación de VP6 en el proceso de entrada de los rotavirus.

No obstante que la interacción VP6-Hsc70 supone la posibilidad de la ocurrencia de cambios conformacionales en VP6, la ausencia de infectividad de las DLPs sugiere que estas partículas podrían carecer de todos los cambios conformacionales necesarios en el proceso de entrada e internalización de esta sub-partícula rotaviral y que contribuciones de VP4, VP7 y de otras moléculas de la célula serían requeridas para la facilitación de su translocación a través de la membrana celular. A partir de estudios bioquímicos de complejos DLP-anticuerpos, se ha propuesto que el efecto inhibitorio de anticuerpos sobre la actividad de transcripción de las DLPs implicaría la interferencia de cambios conformacionales en la capa conformada

por la VP6 (140). Se podría especular que tales cambios conformacionales solo podrían ser posibles si la partícula viral completa (TLP) transita a través de las interacciones previas que implican la participación de VP4, VP7, moléculas receptoras de la superficie celular y asociadas al evento de penetración, para culminar en la translocación de las DLPs a través de la membrana y su ubicación en el citoplasma en su condición transcripcionalmente activa.

Se debe destacar que los eventos del proceso de entrada del virus a la célula tienen lugar sobre la superficie celular (141,142). Por lo tanto, las estrategias de interferencia de la infección a nivel de esta etapa se han visto justificadas debido a que se podrían llevar a cabo con moléculas que no permean la membrana celular, y por lo tanto no ingresarían al metabolismo de la célula ni se acumularían dentro de ella. No obstante, se abre también la posibilidad del ensayo de inhibidores, que aunque ingresen a la célula, correspondan por su naturaleza química a modificadores del estado de óxido-reducción extracelular y intracelular con aprobación para uso terapéutico en humanos, o que hagan parte de la dieta anti-estrés oxidativo.

En nuestro laboratorio actualmente se estudian moléculas potencialmente reactantes con grupos tiol/disulfuro, las cuales han producido drásticas disminuciones de la infección rotaviral en un modelo animal (Datos no publicados). Agentes anti-rotavirales se podrían basar en ligandos naturales de los receptores celulares. Algunas moléculas también podrían actuar a manera de antagonistas de las proteínas (o dominios de éstas) receptoras del virus en la superficie celular.

También podrían ensayarse varios inhibidores simultáneamente, con el propósito de aumentar la eficiencia del tratamiento. Serían preferibles aquellos inhibidores que pudieran ser administrados por

vía oral. Sin embargo, una conclusión inevitable a partir del modelo aquí propuesto es la reafirmación de la complejidad del mecanismo de entrada de los rotavirus a la célula hospedera.

## Referencias

1. **Parashar U, Bresee J, Glass R.** Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 304-306.
2. **Panatto D, Amicizia D, Ansaldi F, Marocco A, Marchetti F, Bamfi F, Giacchino R, et al.** Burden of rotavirus disease and cost-effectiveness of universal vaccination in the Province of Genoa (Northern Italy). *Vaccine.* 2009 [In press].
3. **Nelson EAS, Bresee JS, Parashar UD, Widdoson MA, Glas RI.** Rotavirus epidemiology: The Asian rotavirus surveillance network. *Vaccine.* 2008; 26: 3192-3196.
4. **Wu CL, Yang YC, Huang LM, Chen KT.** Cost-effectiveness of childhood rotavirus vaccination in Taiwan. *Vaccine.* 2009; 27: 1492-1499.
5. **Parez N.** Rotavirus gastroenteritis: Why to back the development of new vaccines? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2008; 31: 253-269.
6. **Anderson EJ. 2008.** Rotavirus[\* No se ha encontrado ningún filtro para la operación requerida. \ En línea, ... \*] vaccines: viral shedding and risk of transmission. *Lancet Infect Dis.* 2008; 8: 642-649.
7. **Arias CF, Romero P, Alvarez V, López S.** Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol.* 1996; 70: 5832-5839.
8. **Ludert JE, Krishnaney AA, Burns JW, Vo PT, Greenberg HB.** Cleavage of rotavirus VP4 in vivo. *J Gen Virol.* 1996; 77: 391-395.
9. **Zarate S, Espinosa R, Romero P, Méndez E, Arias CF, López S.** The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J. Virol.* 2000; 74: 593-599.
10. **Benureau Y, Huet JC, Charpilienne A, Poncet D, Cohen J.** Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilization of outer capsid proteins. *J Gen Virol.* 2005; 86: 3143-3151.
11. **Dimitrov DS.** Virus entry: Molecular mechanism and biomedical applications. *Nature Rev Microbiol.* 2004; 9: 109-122.
12. **Sieczharski SB, Whittaker GR.** Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol.* 2002; 83: 1535-1545.



13. **Marsh M, Helenius A.** Virus entry: open sesame. *Cell.* 2006; 124: 729- 40.
14. **Mayor S, Pagano RE.** Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 603-612.
15. **Pelkmans L, Puntener D, Helenius A.** Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science.* 2002; 296: 535-539.
16. **Chazal N, Gerlier D.** Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67: 226-237.
17. **Sattentau QJ.** Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nature Rev Microbiol.* 2008; 6: 815-26.
18. **Hocini H, Becquart P, Bouhlal H, Chomont N, Ancuta P, Kazatchkine MD, Bélec L.** Active and selective transcytosis of cell-free human immunodeficiency virus through a tight polarized monolayer of human endometrial cells. *J Virol.* 2001; 75: 5370-5374.
19. **Este, J. A.** Virus entry as a target for anti-HIV intervention. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10: 1617-1632.
20. **Crawford SE, Patel DG, Cheng E, Berkova Z, Hyser JM, Ciarlet M, Finegold MJ, et al.** Rotavirus Viremia and Extraintestinal Viral Infection in the Neonatal Rat Model. *J Virol.* 2006; 80: 4820-4832
21. **Blutt SE, Matson DO, Crawford SE, Staat MA, Azimi P, Bennett BL, Piedra PA, et al.** Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *Plos Med.* 2007; 4: 0660-0668.
22. **Chitambar SD, Tatte VS, Dhongde R, Kalrao V.** High frequency of rotavirus viremia in children with acute gastroenteritis: Discordance of strains detected in stool and sera. *J. Med. Virol.* 2008; 80: 2169-2176
23. **Ciarlet M, Crawford SE, Cheng E, Blutt SE, Daren A, Rice DA, Bergelson JM, et al.** VLA-2 (a2b1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. *J Virol.* 2002; 76: 1109-1123.
24. **López S, Arias CF.** Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 2004; 12: 271-278.
25. **Lopez,S. Arias,C.F.** 2006. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006; (309): 39-66.
26. **Calderon MN, Acosta O, Guerrero CA, Guzman F.** Protein disulfide isomerase activity is involved in rotavirus entry to MA104 cells. *Proceedings of the XIV International Congress of Virology,* Istanbul. 2008; pp. 163-164.
27. **Bass D, Mackow E, Greenberg HB.** Identification and partial characterization of a rhesus rotavirus binding glycoprotein on murine enterocytes. *Virology.* 1991; 183: 602-610.
28. **Delorme C, Brüssow H, Sidoti J, Roche N, Karlsson KA, Neeser JR, Teneberg S.** Glycosphingolipid binding specificities of rotavirus: identification of a sialic acid-binding epitope. *J Virol.* 2001; 75 : 2276-87.
29. **Guerrero CA, Zarate Corkidi SG, López S, Arias CF.** Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* 2000; 74: 9362-9371.
30. **Guo CT, Nakagomi O, Mochizuchi M, Ishida H, Kiso M, Ohta Y, Suzuki T, et al.** Ganglioside GM1a on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. *J Biochem.* 1999; 126: 683-688.
31. **Jolly CL, Beisner BM, Holmes IH.** Rotavirus infection of MA104 cells is inhibited by Ricinus lectin and separately expressed single binding domains. *Virology.* 2000; 275: 89-97.
32. **Jolly CL, Huang JA, Holmes IH.** Selection of rotavirus VP4 cell receptor binding domains for MA104 cells using a phage display library. *J Virol Methods.* 2001; 98: 41-51.
33. **Superti F, Donelli G.** Gangliosides as binding sites in SA-11 rotavirus infection of LLC-MK2 cells. *J. Gen. Virol.* 1991; 72:2467-2474.
34. **Haselhorst T, Fleming FE, Dyason JC, Hartnell RD, Yu X, Holloway G, Santegoets K, et al.** Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nature Chem Biol.* 2009; 5: 91-93.
35. **Ciarlet M, Estes MK.** Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J. Gen Virol.* 1999; 80: 943-948.
36. **Isa P, López S, Segovia L, Arias CF.** Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotavirus. *J. Virol.* 1997; 71: 6749-6756.
37. **Méndez E, Arias CF, López S.** Binding to sialic acid is not an essential step for the entry of animal rotavirus to epithelial cells in culture. *J. Virol.* 1993; 67: 5253-5259.
38. **Zárate S, Espinosa R, Romero P, Guerrero CA, Arias CF, López S.** Integrin a2b1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology.* 2000; 278: 50-54.
39. **Stewart PL, Nemerow GR.** Cell integrins: commonly used receptors for diverse viral pathogens. *Trends in Microbiol.* 2007; 15(11): 500-7.

40. **Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ.** Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94: 5389-5394.
41. **Guerrero CA, Méndez E, Zarate S, Isa P, Lopez S, Arias CF.** Integrin avb3 mediates rotavirus cell entry. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2000; 97: 14644-14649.
42. **Hewish M, Takada Y, Coulson BS.** Integrins a2b1 and a4b1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J. Virol.* 2000; 74: 228-236.
43. **Londrigan SL, Graham KL, Takada Y, Halasz P, Coulson BS.** Monkey Rotavirus binding to a2b1 integrin requires the a2 I domain and is facilitated by the homologous b1 subunit. *J Virol.* 2003; 77: 9486-9501.
44. **Graham KL, Fleming FE, Halasz P, Hewish MJ, Nagesha H, Holmes IH, Takada Y, et al.** Rotaviruses interact with a4b7 and a4b1 integrins by binding the same integrin domains as natural ligands. *J Gen Virol.* 2005; 86: 3397-3408.
45. **Graham KL, Halasz P, Tan Y, Hewish MJ, Takada Y, Mackow ER, Robinson MK, et al.** Integrin-using rotaviruses bind a2b1 Integrin a2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize aXb2 and aVb3 by using VP7 during cell entry. *J Virol.* 2003; 77: 9969-9978.
46. **Bergelson JM, John NS, Kawaguchi S, Chan M, Studdal H, Modlin J, Finberg RW.** Infection by echoviruses 1 and 8 depends on the a2 subunit of human VLA-2. *J. Virol.* 1993; 67: 6847-6852.
47. **Roivainen M, Piirainen L, Hovi T, Virtanen I, Riikonen T, Heino J, Hyypia T.** Entry of coxsackievirus A9 into host cells: specific interactions with av<sup>23</sup> integrin, the vitronectin receptor. *Virology.* 1994; 203: 357-365.
48. **Jackson T, Sheppard D, Denyer M, Blakemore W, King A.** The epithelial integrin avb6 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 2000; 74: 4949-4956.
49. **Wickham T, Mathias P, Cheresch D, Nemerow G.** Integrins avb3 and avb5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell.* 1993; 73:309-319.
50. **Evander M, Frazer I, Payne E, Qi Y, Hengst K, McMillan N.** Identification of the a6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* 1997; 71: 2449-2456.
51. **Graham KL, Takada Y, Coulson BS.** 2006. Rotavirus spike protein VP5\* binds a2b1 integrin on the cell surface and competes with virus for cell binding and infectivity. *J Gen Virol.* 2006; 87: 1275-1283.
52. **Ludert JE, Ruiz MC, Hidalgo C, Liprandi F.** Antibodies to rotavirus outer capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsulation. *J Virol.* 2002; 76: 6643-6651.
53. **Bhattacharya A, Kurochkin AV, Yip GNB, Zhang Y, Bertelsen EB, Zuiderweg ERP.** Allosteric in the Hsp70 chaperones is transduced by subdomain rotations. *J Mol Biol.* 2009 [In Press].
54. **Jiang J, Prasad K, Lafer EM, Sousa R.** Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol Cell.* 2005; 20: 513-524.
55. **Saibil HR.** Chaperone machines in action. *Curr Opin Struct Biol.* 2008; 18: 35-42.
56. **Multhoff G, Hightower LE.** Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress Chap.* 1996; 1:167-176.
57. **Guerrero CA, Bouyssonade D, Zárate S, Isa P, López T, Espinosa R, Romero P, et al.** Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J. Virol.* 2002;76: 4096-4102.
58. **Zárate S, Cuadras MA, Espinosa R, Romero P, Juárez KO, Camacho-Nuez M, Arias CF, et al.** Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J. Virol.* 2003; 77: 7254-7260.
59. **Pérez-Vargas J, Romero P, Lopez S, Arias CF.** Peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity. *J Virol.* 2006; 80: 3322-3331.
60. **Gualtero DF, Guzman 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: 2183-2196.
61. **Garaicoechea L, Olichon A, Marcoppido G, Wigdorovitz A, Mozgovej M, Saif L, Surrey T, Parreno V.** Llama VHH directed to rotavirus VP6 protein possess broad neutralizing activity in vitro and confer protection against diarrhoea in mice. *J. Virol.* 2008; 82(19): 9753-9764.
62. **Mamathambika BS, Bardwell JC.** Disulfide-linked protein folding pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2008; 24: 211-235.
63. **Jordan PA, Gibbins JM.** Extracellular disulfide exchange and the regulation of cell function. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8: 312-324.
64. **Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A.** Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol.* 2002; 193: 154-163.



65. **Appenzeller-Herzog C, and Ellgaard L.** The human PDI family: versatile packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1783: 535-548.
66. **Ferrari D, Soling HD.** The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J.* 1999; 339: 1-10.
67. **Tager M, Kroning H, Thiel U, Ansoerge S.** Membrane-bound protein disulfide isomerase PDI is involved in regulation of surface expression of thiols and drug sensitivity of B-CLL cells. *Exp Hematol.* 1997; 25: 601-607.
68. **Lahav J.** A new regulatory disulfide isomerase on the platelet surface. *Blood.* 2005; 105: 1378-1379.
69. **Jordan PA, Stevens JM, Hubbard GP, Barrett NE, Sage T, Authi KS, Gibbins JM.** A role for the thiol isomerase protein ERP5 in platelet function. *Blood.* 2005; 105: 1500-1507.
70. **Ryser HJ.** Plasma Membrane Protein Disulfide Isomerase: Its role in the translocation of diphtheria toxin and hiv virus across endosomal and cell membranes. *In: Plasma membrane redox systems and their role in biological stress and disease (Azard, H. et al., eds) pp 279-307, Kluwer Academic Publishers.* 1999.
71. **Essex DW.** Redox control of platelet function. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11: 1191-1225.
72. **O'Neill S, Robinson A, Deering A, Ryan M, Fitzgerald DJ, Moran N.** The platelet integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  has an endogenous thiol isomerase activity. *J Biol Chem.* 2000; 275: 36984-36990.
73. **Lahav J, Wijnen EM, Hess O, Hamaia SW, Griffiths D, Markis M, Knight CG, et al.** Enzymatically catalyzed disulfide exchange is required for platelet adhesion to collagen via integrin  $\alpha_2\beta_1$ . *Blood.* 2003; 102: 2085-2092.
74. **Essex DW, Li M.** Redox control of platelet aggregation. *Biochemistry.* 2003; 42: 129-136.
75. **Swiatkowska M, Szymanski J, Padula G Cier-niewski CS.** Interaction and functional association of protein disulfide isomerase with  $\alpha_v\beta_3$  integrin on endothelial cells. *FEBS J.* 2008; 275: 1813-1823.
76. **Schwartz BR, Harlan JM.** Sulphydryl reducing agents promote neutrophil adherence without increasing surface expression CD11b/CD18 (Mac-1 Mo1). *Biochem Biophys Res Comm.* 1989; 169: 51-57.
77. **Mandel R, Ryser HJ, Ghani F, Wu M, Peak D.** Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 4112-4116.
78. **Markovic I, Stantchev TS, Fields KH, Tiffany LJ, Tomić M, Weiss CD, Broder CC, et al.** Thiol/disulfide exchange is a prerequisite for CXCR4-tropic HIV-1 envelope-mediated T-cell fusion during viral entry. *Blood.* 2004; 103: 1586-94.
79. **Auwerx J, Isacson O, Söderlund J, Balzarini J, Johansson M, Lundberg M.** Human glutaredoxin-1 catalyzes the reduction of HIV-1 gp120 and CD4 disulfides and its inhibition reduces HIV-1 replication. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41: 1269-1275.
80. **Ou W, Silver J.** Role of protein disulfide isomerase and other thiol-reactive proteins in HIV-1 envelope protein-mediated fusion. *Virology.* 2006; 350: 406-417.
81. **Gallina A, Mandel R, Trahey M, Broder, CC, Ryser HJP.** Inhibitors of protein disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry. *J Biol Chem.* 2002; 277: 50579-50588.
82. **Mirazimi A, Svensson L.** Carbohydrates facilitate correct disulfide bond formation and folding of rotavirus VP7. *J Virol.* 1998; 75: 3887-3892.
83. **Maruri-Avidal L, López S, Arias CF.** Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles. *J Virology.* 2008; 82: 5368-5380.
84. **Svensson L, Dormitzer PR, von Bonsdorff CH, Maunula L, Greenberg HB.** Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly. *J Virol.* 1994; 68: 5204-5215.
85. **Guerrero CA.** Identificación y caracterización de receptores celulares para rotavirus. Tesis de PhD. Universidad Nacional Autónoma de México. 2000.
86. **Vincent S, Gerlier D, Manié SN.** Measles virus assembly within membrane rafts. *J. Virol.* 2000; 74: 9911-9915.
87. **Slimane TA, Trugnan G, van IJzendoorn SCD, Hoekstra D.** Raft-mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells: Role of distinct lipid microdomains. *Mol Biol Cell.* 2003; 14: 611-624.
88. **Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Andrej Shevchenko A, Simons K.** Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 5795-5800.
89. **Manes S, del Real G, Martínez AC.** Pathogens: Raft hijackers. *Nature Rev Immunol.* 2003; 3: 557-568.
90. **Li PL, Gulbins E.** Lipid rafts and redox signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9: 1411-1416.



91. **Lopez S, Arias CF.** Attachment and postattachment receptors for rotaviruses. *in:* Gray, J. Viral Gastroenteritis. Holanda. Elsevier Science. pp. 143-163. 2003.
92. **Cuadras MA, Greenberg HB.** Rotavirus infectious particles use lipid rafts during replication for transport to the cell surface *in vitro* and *in vivo*. *Virology.* 2003; 313: 308-321.
93. **Isa P, Realpe M, Romero P, López S, Arias CF.** Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology.* 2004; 322 370-381.
94. **Mohan KV, Muller J, Atreya CD.** Defective rotavirus particle assembly in lovastatin-treated MA104 cells. *Arch Virol.* 2008; 153, [In press].
95. **Moore JP, Doms RW.** The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 10598-10602
96. **Matsuyama S, Taguchi F.** Receptor-Induced Conformational Changes of Murine Coronavirus Spike Protein. *J Virol.* 2002; 76: 11819-11826.
97. **Wouters MA, Lau KK, Hogg PJ.** Cross-strand disulphides in cell entry proteins: poised to act. *Bioessays.* 2004; 26:73-79.
98. **Klenk HD, Garten W.** Activation cleavage of viral spike proteins by host proteases. *In:* "Cellular Receptors for Animal Viruses" (E. Wimmer, ed.), pp. 241-280, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994.
99. **Skehel JJ, Wiley DC.** Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69: 531-569.
100. **Jain S, McGinnes LW, Morrison TG.** Role of thiol/disulfide exchange in Newcastle disease virus entry. *J Virol.* 2008; 82: 12039-12048.
101. **Cavalli A, Prota AE, Stehle T, Dermody TS, Recanatini M, Folkers G, Scapozza L.** A molecular dynamics study of reovirus attachment protein sigma1 reveals conformational changes in sigma1 structure. *Bioophys. J.* 2004; 86: 3423-3431.
102. **Nakano MY, Boucke K, Suomalainen M, Stidwill RP, Greber UF.** The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol. *J. Virol.* 2000; 74: 7085-7095.
103. **Tuthill TJ, Bubeck D, Rowlands DJ, Hogle JM.** Characterization of Early Steps in the Poliovirus Infection Process: Receptor-Decorated Liposomes Induce Conversion of the Virus to Membrane-Anchored Entry-Intermediate Particles. *J. Virol.* 2006; 80: 172-180.
104. **Levy HC, Bowman VD, Govindasamy L, McKenna R, Nash K, Warrington K, Chen W, et al.** Heparin binding induces conformational changes in adeno-associated virus serotype 2. *J. Struct Bio.* 2009; 165: 146-156.
105. **Isa P, Gutiérrez M, Arias CF, López S.** Rotavirus cell entry. *Future Virol.* 2008; 3: 135-146.
106. **Yoder JD, Dormitzer PR.** Alternative intermolecular contacts underlie the rotavirus VP5\* two- to three-fold rearrangement. *EMBO J.* 2006; 25: 1559-1568.
107. **Dormitzer PR, Nason EB, Prasad BVV, Harrison SC.** Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature.* 2004; 430: 1053-1058.
108. **Estes MK.** Rotaviruses and their replication, *In:* Knipe D., Howley P.M., Griffin D.F., Martin M.A., Lamb R.A., Roizman B., Straus SE. (Eds.), Fields Virology, 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia pp. 1747-1786. 2001.
109. **Kaljot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg HB.** Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol.* 1988; 62: 1136-1144.
110. **Ruiz MC, Cohen J, Michelangeli F.** Role of Ca<sup>2+</sup> in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium.* 2000; 28: 137-149.
111. **Sánchez-San Martín C, López T, Arias CF, López S.** Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol.* 2004; 78: 2310-2318.
112. **Mears JA, Ray P, Hinshaw JE.** A corkscrew model for dynamin constriction. *Structure.* 2007;15: 1190-1202.
113. **Roux A, Uyhazi K, Frost A, De Camilli P.** GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature.* 2006; 441:528-531.
114. **Nabi IR, Le PU.** Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol.* 2003; 161: 673-677.
115. **Lajoie P, Nabi IR.** Regulation of raft-dependent endocytosis. *J Cell Mol Med.* 2007; 11: 644-653.
116. **Lamaze C, Dujeancourt A, Baba T, Lo C, Benmerah A, Dautry-Varsat A.** Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell.* 2001; 7: 661-671.
117. **Le PU, Guay G, Altschuler Y, Nabi IR.** Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 2002; 277; 3371-3379.



118. **Pang H, Le PU, Nabi IR.** Ganglioside GM1 levels are a determinant of the extent of caveolae/raft-dependent endocytosis of cholera toxin to the Golgi apparatus. *Journal of Cell Science*. 2004;117: 1421-1430.
119. **Ludert JE, Michelangeli F, Gil F, Liprandi F, Esparza J.** Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology*. 1987; 27: 95-101.
120. **Ruiz MC, Aristimuño OC, Díaz Y, Peña F, Chemello ME, Rojas H, Ludert JE, Michelangeli F.** Intracellular disassembly of infectious rotavirus particles by depletion of Ca<sup>2+</sup> sequestered in the endoplasmic reticulum at the end of virus cycle. *Virus Research*. 2007; 130: 140-150.
121. **Dormitzer PR, Greenberg HB, Harrison SC.** Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers. *Virology*. 2000; 277: 420-428.
122. **Chemello ME, Aristimuno OC, Michelangeli F, Ruiz MC.** Requirement for vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity and Ca<sup>2+</sup> gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *J Virol*. 2002; 76: 13083-13087.
123. **Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH, Gerasimenko OV.** Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. *Curr Biol*. 1998; 8: 1335-1338.
124. **Ruiz MC, Abad MJ, Charpilienne A, Cohen AJ, Michelangeli F.** Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus. *J Gen Virol*. 1997; 78: 2883-2893.
125. **Bayer N, Schober D, Prchla E, Murphy RF, Blaas D, Fuchs R.** Effect of Bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: Implications for viral uncoating and infection. *J Virol*. 1998; 72: 9645-9655.
126. **Méndez E, López S, Cuadras MA, Romero P, Arias CF.** 1999. Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology*. 1999; 263: 450-459.
127. **Ellgaard L, Ruddock LW.** The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep*. 2005; 6: 28-32.
128. **Dormitzer PR, Sun ZY, Wagner G, Harrison SC.** The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J*. 2002; 21: 885-897.
129. **Tihova M, Dryden KA, Bellamy AR, Greenberg HB, Yeager M.** Localization of membrane permeabilization and receptor binding sites on the VP4 hemagglutinin of rotavirus: implications for cell entry. *J Mol Biol*. 2001; 314: 985-992.
130. **Ludert JE, Mason BB, Angel J, Tang B, Hoshino Y, Feng N, Vo PT, et al.** Identification of mutations in the rotavirus protein VP4 that alter sialic acid-dependent infection. *J Gen Virol*. 1998; 79: 725-729.
131. **Ren J, Ding T, Zhang W, Song J, Ma W.** Does Japanese encephalitis virus share the same cellular receptor with other mosquito-borne flaviviruses on the C6/36 mosquito cells? *Virology J*. 2007; 4: 83.
132. **Morshauer RC, Hu W, Wang H, Pang Y, Flynn GC, Zuiderweg ER.** High-resolution solution structure of the 18 kDa substrate-binding domain of the mammalian chaperone protein HSC70. *J Mol Biol*. 1999; 289: 1387-1403.
133. **Morimoto RI.** Dynamic remodeling of transcription complexes by molecular chaperones. *Cell*. 2002; 110: 281-284.
134. **Delmas O, Durand-Schneider AM, Cohen J, Colard O, Trugnan G.** Spike protein VP4 assembly with maturing rotavirus requires a postendoplasmic reticulum event in polarized Caco-2 cells. *J Virol*. 2004; 78: 10987-10994.
135. **Dowling W, Denisova E, LaMonica R, Mackow ER.** Selective membrane permeabilization by the rotavirus VP5\* protein is abrogated by mutations in an internal hydrophobic domain. *J Virol*. 2000; 74: 6368-6376.
136. **López T, Camacho M, Zayas M, Nájera R, Sánchez R, Arias CF, López S.** Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J Virol*. 2005; 79: 184-192.
137. **Altenburg BC, Graham DY, Estes MK.** Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. *J Gen Virol*. 1980; 46:75-85.
138. **Trask SD, Dormitzer PR.** Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *J Virol*. 2006; 80: 11293-11304.
139. **Patton JT, Hua J, Mansell EA.** Location of intrachain disulfide bonds in the VP5\* and VP8\* trypsin cleavage fragments of the rhesus rotavirus spike protein VP4. *J Virol*. 1993; 67: 4848-4855.
140. **Thouvenin E, Schoehn G, Rey F, Petitpas I, Mathieu M, Vaney MC, Cohen J, et al.** Antibody inhibition of the transcriptase activity of the rotavirus DLP: a structural view. *J Mol Biol*. 2001;131: 161-172.
141. **Ryser HJ, Flückiger R.** Progress in targeting HIV-1 entry. *Drug Discov Today*. 2005; 10: 1085-94.
142. **Phogat SK, Dimitrov DS.** Cell biology of virus entry: a review of selected topics from the 3rd International Frederick meeting. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2003; 1614: 85-88.