



# El calcio y el rotavirus

Marie Christine Lendais de Ruiz <sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Viróloga mcir@cbb.ivic.ve

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

## RESUMEN

Numerosas funciones celulares tanto en la célula normal como en la célula enferma están moduladas por la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. En los procesos patológicos y en particular en la infección inducida por el rotavirus, el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel clave a diferentes niveles. El rotavirus es el agente etiológico responsable de la mayoría de los casos fatales de gastroenteritis en el mundo. Infecta los enterocitos maduros del intestino y su ciclo de replicación depende de los gradientes intracelulares de calcio. La diarrea inducida por este agente tiene diferentes componentes. Recientemente, se ha mostrado que la proteína viral, NSP4, estimula la actividad secretora de los enterocitos por una señal mediada por el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Este componente pudiera estar amplificado por la estimulación del sistema nervioso entérico. Esto genera una diarrea secretora que representaría la fase temprana de la diarrea, antes que se establezca una diarrea osmótica debida a una muerte celular masiva y destrucción de las microvellosidades del epitelio. El estudio de los mecanismos de infección celular por el rotavirus permite una mejor comprensión de las interacciones virus-célula que eventualmente pudiera servir de base al diseño de nuevas estrategias terapéuticas, incluyendo drogas antivirales, que tanto hacen faltan actualmente para combatir los numerosos agentes infecciosos circulantes en el mundo.

## INTRODUCCIÓN

Todas las células se caracterizan por presentar diferentes compartimientos intracelulares separados por membranas lipídicas y proteicas, de composición variable, que les permiten asegurar funciones propias. Por su permeabilidad restringida y los mecanismos activos específicos de regulación que contienen, las membranas aseguran la homeostasis iónica celular. Las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en cada compartimiento y los gradientes que se establecen a través de las membranas, son factores importantes para la vida misma de la célula. En los procesos patológicos y



en particular en las infecciones vírales, el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel clave actuando como mensajero que activa cadenas de eventos que conllevan a la enfermedad.

Los virus son organismos subcelulares con información genética restringida que requieren de un ciclo de vida intracelular de tipo parásito. El pequeño tamaño de su genoma está compensado por una gran eficiencia en cuanto al número de proteínas virales que es capaz de expresar y a su vez, por las múltiples acciones que estas mismas pueden ejercer. Una de las estrategias de los virus para desviar las funciones celulares en su beneficio ha sido la síntesis de proteínas virales que pueden afectar la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ .

Nos proponemos en este artículo presentar interacciones virus-célula dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en el curso de la infección. Enfocaremos el caso del rotavirus reconocido como el agente etiológico más importante de las gastroenteritis virales que afectan niños y animales jóvenes. Es responsable de hasta 71% de las diarreas que requieren hospitalización, y de la muerte de alrededor de 800 000 personas por año en el mundo. Este es un real problema de salud pública en los países en desarrollo y en especial en Venezuela. En nuestro estudio el rotavirus representa un modelo que nos sirve para entender las interacciones complejas, dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , entre el virus y los diferentes tipos celulares del tracto gastrointestinal ligado a la multifuncionalidad del epitelio.

## LA ESTRUCTURA DE LA CÁPSIDE DEL ROTAVIRUS ES DEPENDIENTE DE $\text{Ca}^{2+}$

Los rotavirus constituyen un género de la familia *Reoviridae* que presentan una gran diversidad antigénica que permite clasificarlos en grupos y subgrupos. No presentan envoltura lipídica y la estructura de su cápside ha sido ampliamente estudiada por métodos de crío-electromicroscopía y tratamiento de imágenes. Es un icosaedro constituido de 6 proteínas organizadas en tres capas proteicas concéntricas (Figura 1). El núcleo central está constituido por una capa más interna formada por VP2, que encierra 11 segmentos de RNA de doble cadena y dos proteínas minoritarias, VP1 y VP3. La capa intermediaria constituida por VP6 hace contacto con VP2 por su lado interno y con las proteínas externas VP4 y VP7. VP7 representa la proteína mayoritaria de la última capa, atravesada por espículas formadas por dímeros de VP4.

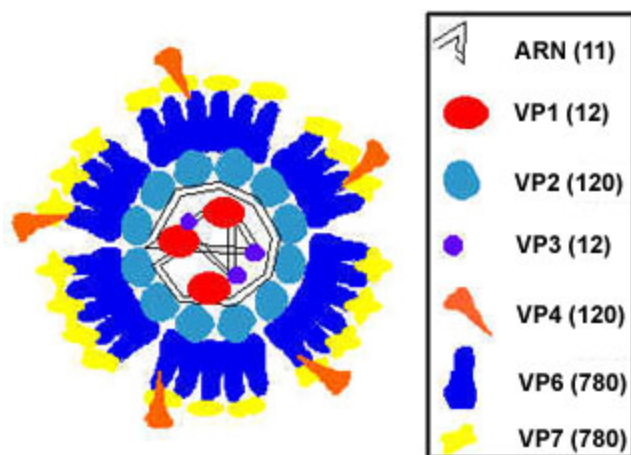


Figura 1. Representación de una partícula de rotavirus. El número que figura a la derecha de los nombres de cada proteína viral de las moléculas, corresponde a número de moléculas por



virion.

La estabilidad de la capa externa depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . La incubación de rotavirus en un medio caracterizado por concentraciones bajas en  $\text{Ca}^{2+}$ , de 10nM a 1 $\mu\text{M}$  según la cepa, induce la solubilización de las proteínas externas. Este tratamiento genera partículas virales de doble capa proteica que no son infecciosas. Una serie de resultados apuntan a VP7 como el sitio de fijación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la cápside. Por otra parte, la incubación del rotavirus en presencia de tripsina induce el clivaje de VP4 en VP5\* y VP8\* lo cual favorece la infectividad.

## UN MODELO DE ENTRADA DEL ROTAVIRUS EN LA CÉLULA

El ciclo de replicación del rotavirus en el organismo huésped ocurre en los enterocitos maduros del intestino delgado. *In vitro* este virus puede también infectar un gran número de células. Los mecanismos ligados a la entrada del rotavirus a la célula aún están en discusión. La VP4 estaría involucrada en la interacción primaria a los receptores celulares. La naturaleza de tales receptores no se conoce con certeza. Sin embargo, se ha mostrado que conjugados sálicos e integrinas podrían estar involucrados. No está claro aún, si la internalización en el citoplasma ocurre por vía de penetración directa a través de la membrana citoplasmática, o por endocitosis.

El rotavirus como otros virus que no presentan envoltura lipídica, debe entrar por una disrupción de la membrana plasmática o endosomal. Los procesos moleculares involucrados en tales mecanismos no han sido aclarados hasta el momento. En esto se diferencia de los virus con membrana lipídica cuya entrada involucra un proceso de fusión entre la membrana viral y la membrana celular (plasmática o endocítica). En general, los virus que presentan o no una cubierta lipídica, y que entran por vía endocítica, requieren de un tratamiento ácido en el endosoma para ser infecciosos. El bajo pH favorece la exposición de péptido(s) de las proteínas virales que interactúa(n) con la membrana celular para inducir la fusión (o disrupción) membranal. Los virus desnudos como el reovirus y el adenovirus o los cubiertos como Influenza, el virus de la gripe, son representantes de esta clase de virus dependientes de pH.

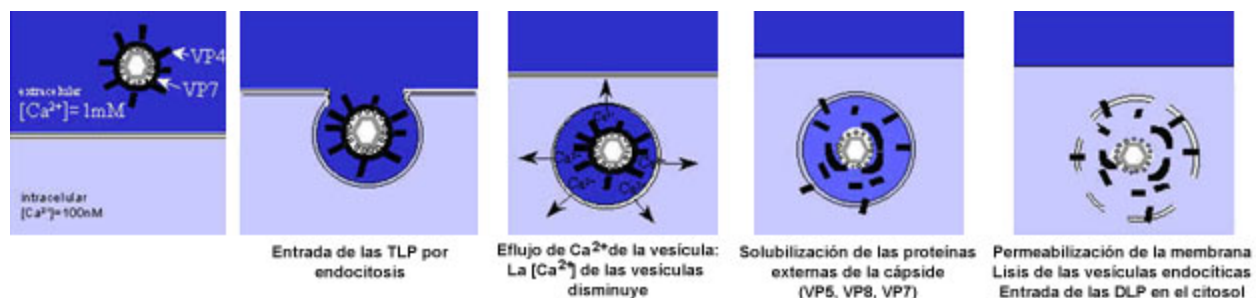


Figura 2. Modelo de entrada del rotavirus a la célula por endocitosis dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$

El rotavirus no depende de un tratamiento ácido para infectar las células lo cual hizo pensar que entra directamente a través de la membrana plasmática. Sin embargo, no se descarta la entrada



por vía endosomal. En este sentido, se ha propuesto una hipótesis novedosa de una entrada por endocitosis dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  e independiente de  $\text{H}^+$ . Esta se basa en las siguientes características del rotavirus: a) la estabilidad de la capa proteica externa depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  garantizada en el medio extracelular, b) las proteínas externas se solubilizan a una concentración baja de  $\text{Ca}^{2+}$  compatible con el medio citosólico (del orden nM) c) una vez en solución, ellas son capaces de inducir la disrupción de las membranas. En este modelo, la entrada comprendería las diferentes etapas como se puede ver en la [figura 2](#). El virus entra en el endosoma en un ambiente de  $\text{Ca}^{2+}$  parecido al medio extracelular (1 mM). Luego, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  bajaría a nivel del citoplasma por difusión a través de la membrana, lo cual induciría la solubilización de las proteínas virales de la capa externa. Los péptidos liberados lisan la membrana endosomal permitiendo así la entrada de las partículas de doble capa proteica en el citoplasma. En este momento empieza la replicación.

## SU CICLO INTRACELULAR REQUIERE DIFERENTES AMBIENTES DE $\text{Ca}^{2+}$

Todos los virus con ARN de doble cadena tienen una ARN polimerasa constitutiva que transcribe el ARN genómico. Esta transcripción corresponde a la primera etapa de la replicación viral. La activación de la transcriptasa ocurre por diferentes modalidades según el virus: por acción de proteasas, en presencia de un ambiente iónico particular, etc. En el caso del rotavirus, la baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma parece ser el factor importante de tal activación. En efecto, ensayos realizados *in vitro*, muestran que virus purificados pueden expresar una actividad transcriptasa por una simple disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  después de la solubilización de las proteínas externas. Por otra parte, cuando se aumenta artificialmente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma durante la infección, se observa una inhibición de la pérdida de la capa proteica externa y de la replicación del rotavirus.

En las horas que siguen la entrada del rotavirus al citosol, se produce una desviación casi total de la síntesis de proteínas celulares a favor del virus. El ciclo de replicación se desarrolla en diferentes regiones de la célula caracterizadas por concentraciones diferentes en  $\text{Ca}^{2+}$ , como se ve ilustrado en la figura 3. Primeramente, se observan en el citoplasma estructuras nuevas llamadas viroplasmas, que corresponden a la acumulación de productos virales: proteínas, ARN y partículas virales precursoras que tienen solamente 2 capas proteicas (DLP). Luego, las DLP entran en el retículo endoplasmático (RE) donde terminan su proceso de maduración. Para ello, interactúan con un receptor intracelular en la membrana del RE, la NSP4, que corresponde a una glicoproteína viral no estructural. La internalización ocurre por gemación donde las partículas adquieren transitoriamente una cubierta lipídica que contiene constitutivamente la VP7. En el transcurso de este evento, la otra proteína externa, VP4, está también internalizada desde el citoplasma, probablemente a través de una asociación a NSP4 y/o VP7, cuyos detalles se desconocen.

Dentro del RE, se produce la exclusión de NSP4 y de los lípidos de la membrana. Paralelamente, VP7 y VP4 son repositionados sobre las partículas para formar la última capa proteica de la cápside. El RE, siendo un reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$ , proporciona un ambiente favorable para tal proceso. Al utilizar artificios experimentales donde se logra vaciar



el RE de  $\text{Ca}^{2+}$ , se detiene la maduración de las partículas virales y se observa una acumulación de su forma transitoria cubierta. También se observa un defecto en la glicosilación de las proteínas virales VP7 y NSP4. Estos efectos son parecidos a los inducidos por la tunicamicina, un inhibidor de la N-glicosilación. En la actualidad, la relación entre  $\text{Ca}^{2+}$ , la glicosilación y la morfogénesis no está clara aún y representa un enfoque de la investigación en el campo. Varios grupos están estudiando el papel de las chaperonas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  residentes en el RE y de los oligosacáridos en el plegamiento correcto de las glicoproteínas VP7 y NSP4, en el proceso de maduración del rotavirus.

## INFECCIÓN VIRAL Y HOMEOSTASIS DE $\text{Ca}^{2+}$

Al final del ciclo de replicación, los virus sintetizados son liberados al medio extracelular por diferentes mecanismos. La lisis de la célula huésped representa una estrategia viral relativamente común. La infección con el rotavirus provoca la perturbación de algunas funciones celulares. En particular, induce cambios en la homeostasis iónica, alterando progresivamente la permeabilidad de las membranas plasmáticas a los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas modificaciones se deben a la síntesis de productos virales aún no conocidos. Una consecuencia de esta alteración es el aumento del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula, que conlleva a un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma y en los depósitos intracelulares como el RE. Aparentemente, los mecanismos de regulación están activados para compensar tal entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático juega un papel importante en la activación de la cascada de eventos que conducen a la muerte celular. En efecto, si en el curso de la infección se reduce el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, bien sea bloqueando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  con inhibidores de los canales o más bien impidiendo este aumento con un quelante intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , la muerte se ve retardada. Sin embargo, se piensa que conjuntamente con el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$ , hay otros parámetros que pueden intervenir en la muerte celular. NSP4 podría representar un posible factor, ya que tiene actividad citotóxica cuando está expresada endógenamente en células de cultivo.

La muerte celular inducida por el rotavirus es de tipo necrótico (oncosis) y no apoptótico. Esta se caracteriza, entre otros parámetros, por una pérdida de la integridad de la membrana sin la formación de cuerpos apoptóticos. La lisis celular inducida por la infección permite la diseminación en el medio extracelular de todos los productos virales (partículas y proteínas) que pueden interactuar con las células vecinas. Este mecanismo tiene una implicación importante en la propagación de la infección y la patogénesis de la diarrea.

## LA DIARREA INDUCIDA POR EL ROTAVIRUS

La génesis de la infección con rotavirus depende a la vez de factores ligados al huésped como al virus. La diarrea inducida por el rotavirus tiene varios componentes (Figura 3). Desde hace tiempo se sabe que la infección inducida



por rotavirus está caracterizada por su replicación en los enterocitos del intestino delgado y la lisis celular. Después de varios ciclos, estas lesiones provocan un acortamiento de las vellosidades y una reducción de la capacidad absorbente del intestino, lo cual genera una diarrea osmótica. Luego, el cuadro diarreico se complica. La reducción de las vellosidades conlleva a una estimulación de la división celular. Esto produce una hiperplasia de las células de las criptas, que se traduce en hipersecreción y aumento del síndrome que puede llevar a la deshidratación. Sin embargo, estas modificaciones ocurren a tiempos tardíos, a partir de las 24-36 horas post-infección cuando ya se inició la diarrea. La inducción temprana de la patología se debe a otros factores que han sido el objeto de intensos estudios.

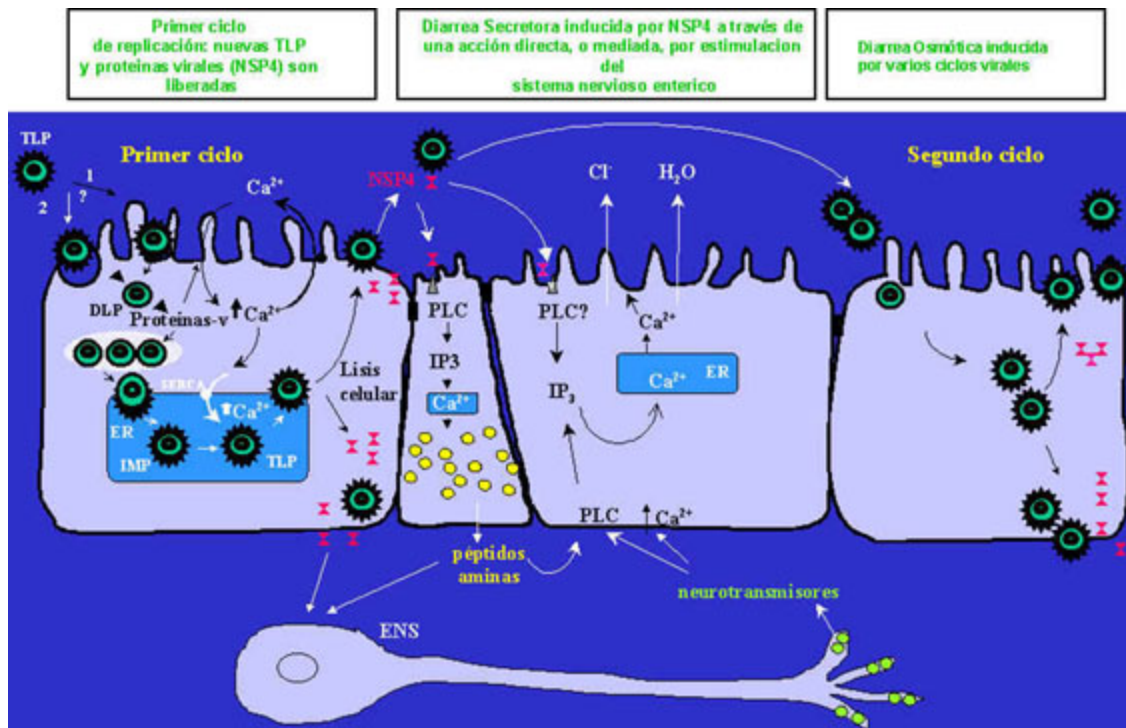


Figura 3. Modelo propuesto de la génesis de la diarrea inducida por rotavirus.

Recientemente, el grupo de Estes ha propuesto que la proteína viral NSP4 es la responsable de la fase temprana de la diarrea, actuando como las enterotoxinas bacterianas. Ellos encontraron que la NSP4 purificada es capaz de inducir la diarrea en ratones recién nacidos, sin inducir cambios histológicos. Para ello, la NSP4 se une a un receptor sensible a proteasas, produciendo un aumento de calcio intracelular por activación de la cascada de la fosfolipasa C? IP<sub>3</sub>. Los datos electrofisiológicos de la mucosa aislada, muestran que el péptido NSP4 potencia la secreción de cloruro inducida por los agentes colinérgicos, a través de una vía de transducción dependiente de Ca<sup>2+</sup>. Nuevos resultados indican que el canal de cloruro involucrado es activable solamente en animales jóvenes. Además, este canal es diferente del canal de cloruro, CFTR, sensible a agentes colinérgicos y a AMP cíclico y cuyo defecto está asociado a la fibrosis quística.

Muy recientemente un grupo de la Universidad de Góteborg propone la participación del sistema nervioso entérico localizado en la pared del intestino en la inducción de la secreción masiva y rápida de electrolitos y de agua. Ellos mostraron que diferentes drogas que bloquean la



transmisión nerviosa a este nivel, eran capaces de inhibir la secreción por la mucosa intestinal y la diarrea inducida por el rotavirus. Este modo de acción ha sido descrito para toxinas liberadas por algunas bacterias. En el caso del rotavirus, se deben determinar los procesos involucrados en la estimulación del sistema. Se piensa que la NSP4 por su capacidad de inducir una señal intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  podría jugar un papel induciendo una estimulación, directa o indirectamente a través de la liberación de mediadores peptídicos y aminas de otros tipos celulares de la mucosa. Esto representa un modelo atractivo que queda por estudiar. Es claro que el entendimiento de la secreción excesiva de fluido inducida por el rotavirus representa la primera etapa en el diseño de una terapia racional para el tratamiento de la diarrea.

## CONCLUSIÓN

El calcio interviene a diferentes niveles en el curso de la infección inducida por el rotavirus. En el medio extracelular, asegura la estabilidad de la cápside viral. Luego, en el momento de la entrada del virus a la célula permite la pérdida de su cápside y la activación de la transcriptasa. La multiplicación viral perturba la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  y favorece la morfogénesis viral y la muerte celular.

La diarrea generada por el rotavirus tiene varios componentes. Tempranamente estaría ligada a NSP4 a través de un señal de transducción mediado por el  $\text{Ca}^{2+}$ . También la estimulación del sistema nervioso entérico podría tener un efecto amplificador. La diarrea inducida más tardíamente sería de tipo osmótico por defecto en la absorción, debido al acortamiento de las vellosidades del intestino.

El estudio del rotavirus representa un modelo para el entendimiento de las interacciones virus-célula. Esto puede permitir el diseño de nuevas drogas antivirales que tanto hacen faltan actualmente para combatir los numerosos agentes infecciosos circulantes en el mundo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ruiz MC, Charpilienne A, Liprandi F, Gajardo R, Michelangeli F, Cohen J. The concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. J Virol 1996;70(8):4877-83.
- Dormitzer PR, Greenberg HB. Calcium chelation induces a conformational change in recombinant herpes simplex virus-1-expressed rotavirus VP7. Virology 1992;189:828-832
- Gajardo R, Vende P, Poncet D, Cohen J. Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein. J Virol 1997;71(3):2211-6.
- Clark SM, Roth JR, Clark L, Barnett BB, Spendlove RS. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. J. Virol. 1981;39:816-822
- Zarate S, Espinosa R, Romero P, Mendez E, Arias CF, Lopez S. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. J Virol 2000;74(2):593-9.
- Zarate S, Espinosa R, Romero P, Mendez E, Arias CF, Lopez S. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. J Virol 2000;74(2):593-9



- 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 U S A* 1997;94(10):5389-94
- Hewish MJ, Takada Y, Coulson BS. Integrins  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 4\beta 1$  can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol* 2000;74(1):228-36.
- Superti F, Donelli G. Gangliosides as binding sites in SA-11 rotavirus infection of LLC-MK2 cells. *J.Gen.Virol.* 1991;72:2467-2474.
- Martinez CG, Guinea R, Benavente J, Carrasco L. The entry of reovirus into I cells is dependent on vacuolar proton-ATPase activity. *J.Virol.* 1996;70:576-579
- Perez L, Carrasco L. Involvement of the vacuolar H(+)-ATPase in animal virus entry. *J.Gen.Virol.* 1994;75:2595-2606.
- Guinea R, Carrasco L. Requirement for vacuolar proton-ATPase activity during entry of influenza virus into cells. *J.Virol.* 1995;69:2306-2312.
- Keljo DJ, Kuhn M, Smith A. Acidification of endosomes is not important for the entry of rotavirus into the cell. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988;7(2):257-63.
- Ludert JE, Michelangeli F, Gil F, Liprandi F, Esparza J. Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology* 1987;27:95-101.
- Ruiz MC, Abad MJ, Charpilienne A, Cohen J, Michelangeli F. Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus. *J Gen Virol* 1997;78(Pt 11):2883-93.
- Ruiz MC, Alonso Torre SR, Charpilienne A, Vasseur M, Michelangeli F, Cohen J, et al. Rotavirus interaction with isolated membrane vesicles. *J.Virol.* 1994;68:4009-4016
- Cohen J, Laporte J, Charpilienne A, Scherrer R. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch.Virol.* 1979;60:177-186.
- Au KS, Chan WK, Burns JW, Estes MK. Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *J.Virol.* 1989;63:4553-4562.
- Meyer JC, Bergmann CC, Bellamy AR. Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28. *Virology* 1989;171(1):98-107.
- Michelangeli F, Liprandi F, Chemello ME, Ciarlet M, Ruiz MC. Selective depletion of stored calcium by thapsigargin blocks rotavirus maturation
- But not the cytopathic effect. *J Virol* 1995;69(6):3838-47
- Poruchynsky MS, Maass DR, Atkinson PH. Calcium depletion blocks the maturation of rotavirus by altering the oligomerization of virus-encoded proteins in the ER. *J.Cell Biol.* 1991;114:651-656.
- Mirazimi A, Nilsson M, Svensson L. The molecular chaperone calnexin interacts with the NSP4 enterotoxin of rotavirus in vivo and in vitro. *J Virol* 1998;72(11):8705-9.
- Michelangeli F, Ruiz MC, del Castillo JR, Ludert JE, Liprandi F. Effect of rotavirus infection on intracellular calcium homeostasis in cultured cells. *Virology* 1991;181:520-527.
- Del Castillo JR, Ludert JE, Sanchez A, Ruiz MC, Michelangeli F, Liprandi F. Rotavirus infection alters Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> homeostasis in MA-104 cells. *J.Gen.Virol.* 1991;72:541-547.



- Perez JF, Chemello ME, Liprandi F, Ruiz MC, Michelangeli F. Oncosis in MA104 cells is induced by rotavirus infection through an increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *Virology* 1998;252(1):17-27.
- Newton K, Meyer JC, Bellamy AR, Taylor JA. Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 alters plasma membrane permeability in mammalian cells. *J Virol* 1997;71(12):9458-65
- Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* 1996;272(5258):101-4.
- Morris AP, Scott JK, Ball JM, Zeng CQ, O'Neal WK, Estes MK. NSP4 elicits age-dependent diarrhea and  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated  $\text{I}(-)$  influx into intestinal crypts of CF mice. *Am J Physiol* 1999;277(2 Pt 1):G431-G444.