

MECANISMOS DE ENTRADA DE VIRUS: UNA MANERA DE CONOCER A LA CÉLULA

Michelle Gutiérrez* y Susana López

Depto. de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular,
Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos,
México. C. P. 62210. E-mail*: mayret@ibt.unam.mx

RESUMEN

Los virus representan una versión microscópica del caballo de Troya, en la que hacen uso de procesos celulares para poder entrar a la célula e infectarla. La endocitosis es uno de estos procesos que los virus han aprovechado para poder ser internalizados. En esta revisión se presentan las distintas vías de endocitosis conocidas hasta el momento, así como ejemplos de distintos virus que utilizan cada ruta para ingresar a la célula.

Palabras Clave: Caveolas, clatrina, dinamina, endocitosis, entrada de virus.

ABSTRACT

Viruses represent a microscopic version of the Trojan horse by mimicking processes known to the cell to get inside and infect it. Endocytosis is one of these processes that viruses take advantage of to be internalized. In this review, the distinct endocytic pathways known to date are discussed. In addition, a brief overview of the entry of different viruses known to use each of these routes is provided.

Key Words: Caveolae, clathrin, dynamin, endocytosis, virus entry.

INTRODUCCIÓN

La endocitosis es el proceso mediante el cual ingresan a la célula solutos, moléculas y partículas de distintos tipos. Este proceso consiste en la invaginación de la membrana plasmática, formando una vesícula cuyo contenido es transportado del exterior al interior de la célula. La endocitosis tiene un papel fundamental en diferentes procesos celulares como son la respuesta inmune, la comunicación intercelular, la transducción de señales y la homeostasis, tanto celular como del organismo completo.

Este proceso celular está constituido por una red de varios organelos los cuales difieren en su composición proteica y propiedades bioquímicas (Figura 1).

Existen diferentes rutas de endocitosis que son usadas por la célula para llevar a cabo distintas funciones (Figura 1)^{1,2}. Sin embargo, dados los avances metodológicos recientes, así como

la complejidad de este proceso, se siguen encontrando nuevas rutas cuya caracterización es aún incompleta.

Existen varios criterios para clasificar los diferentes tipos de endocitosis, éstos son: el tipo de molécula que se internaliza (toxina, virus, ligando, receptor), el componente que cubre la vesícula (clatrina, caveolina, flotilina, etc.), la participación de GTPasas en el proceso, el mecanismo de escisión de la vesícula de la membrana y la participación del citoesqueleto de actina, entre otros¹.

La presencia de las GTPasas de la familia Rab contribuye a la diferenciación entre los distintos tipos de endosomas. Estas GTPasas son importantes en la regulación del tráfico intracelular porque regulan la fusión de las vesículas a los endosomas. De manera general, la unión del ligando al receptor favorece la formación de la vesícula endocítica. Esta vesícula entrega su cargo a los endosomas tempranos (o endosomas de distribución), organelos con un pH alrededor de 6 donde se localizan las Rab GTPasas 4 y 5. En los casos donde la molécula endocitada es un receptor unido a su ligando, el pH ácido puede promover la

Nota: Artículo recibido el 24 de mayo de 2010 y aceptado el 14 de junio de 2010.

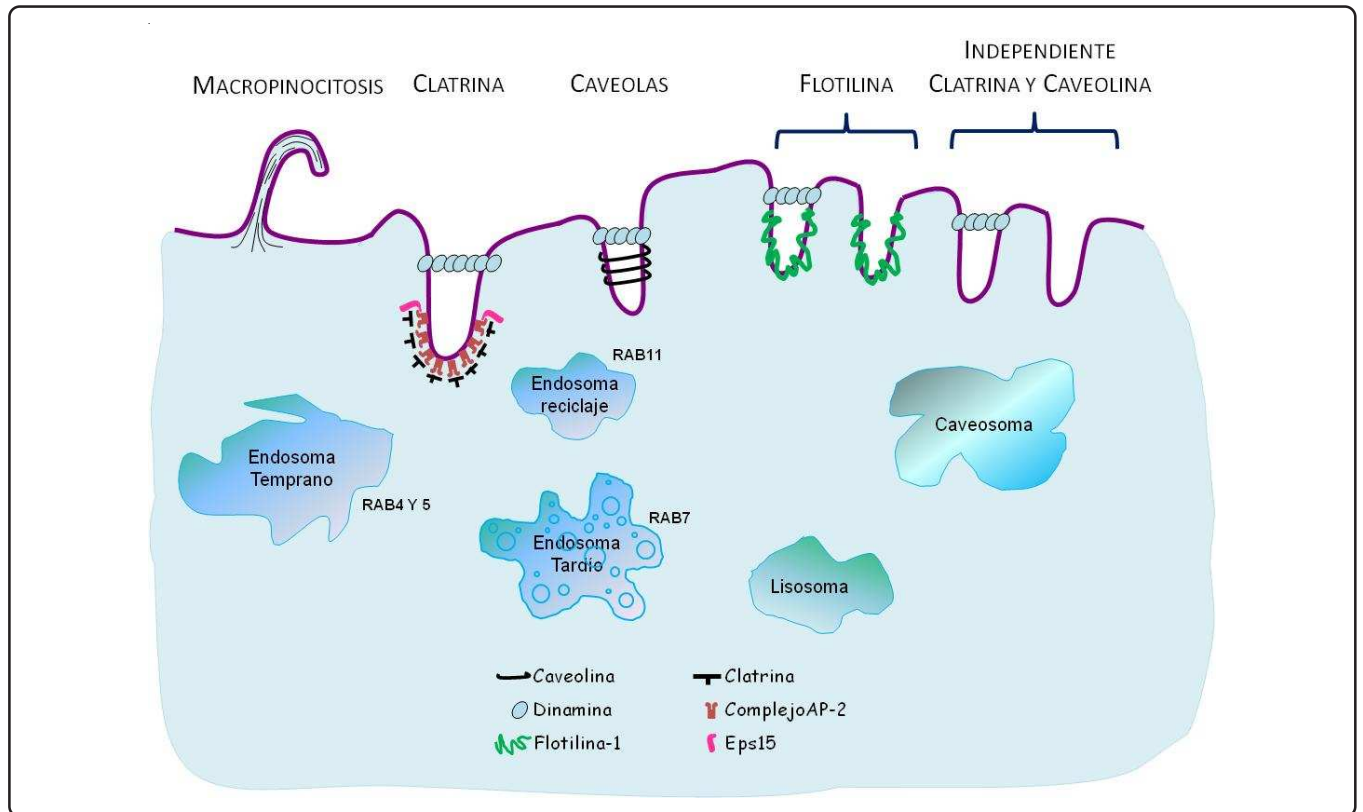


Figura 1. Esquema general de las diferentes rutas de endocitosis. Se muestran las distintas vías de endocitosis y la maquinaria molecular asociada a cada ruta.

disociación del ligando de su receptor. Usualmente, el ligando, el cual permanece en la vía, es degradado, mientras que el receptor entra a los endosomas de reciclamiento (donde está localizada Rab11) para regresar a la membrana celular. Las moléculas que son destinadas a su degradación o que requieren llegar al interior celular, cerca del núcleo, entran a los endosomas tardíos (también conocidos como cuerpos multivesiculares - MVBs-). En estos organelos, con un pH menor a 6, se localiza la GTPasa Rab 7. Finalmente, la molécula endocitada llega a los lisosomas donde puede ser degradada por enzimas que están activas en un ambiente ácido. En el transcurso de toda la ruta endocítica, existen posibles rutas de escape para evitar la degradación en los lisosomas (Figura 1).

A continuación se da una breve descripción de las rutas más conocidas hasta el momento que han sido clasificadas de acuerdo a las proteínas que recubren las vesículas endocíticas.

Endocitosis mediada por clatrina

La endocitosis mediada por clatrina es el mecanismo mejor caracterizado para la entrada de moléculas a la célula. Este tipo de endocitosis requiere una serie de componentes estructurales para poder formar la vesícula de manera que pueda ser internalizada. Uno de estos componentes, y por el cual esta vía recibe su nombre, es la clatrina.

La clatrina es un complejo proteico formado por tres cadenas ligeras y tres cadenas pesadas que constituyen una unidad llamada "el triskelion" (triskelion) de clatrina³. Este complejo es reclutado a la membrana plasmática por proteínas adaptadoras. Una de estas proteínas adaptadoras, es el complejo AP-2, formado por cuatro subunidades (α , β 2, μ 2 y σ 2). El complejo AP-2 interactúa con clatrina, a través de la subunidad β 2, y estimula su polimerización generando una malla de clatrina que cubre la vesícula (Figura 2)⁴. Durante el ensamble progresivo de clatrina en la membrana, ésta va adquiriendo curvatura hasta que se forma la vesícula endocítica. La fisión de la vesícula cubierta con clatrina es controlada por la GTPasa dinamina. Se ha propuesto que la dinamina actúa como una mecano-enzima la cual usa la hidrólisis de GTP para generar la fuerza necesaria para estrangular el cuello y escindir las vesículas de la membrana (Figura 2)⁵.

Existen diferentes maneras de inhibir esta vía de endocitosis. Desde agentes químicos como sacarosa o clorpromazina hasta siRNAs o mutantes dominantes negativas de los componentes estructurales de la vía (Tabla I).

Endocitosis mediada por caveolas

La segunda vía de endocitosis mejor caracterizada es la mediada por caveolas. En esta ruta, las caveolinas son el principal componente estructural. A diferencia de clatrina que requiere

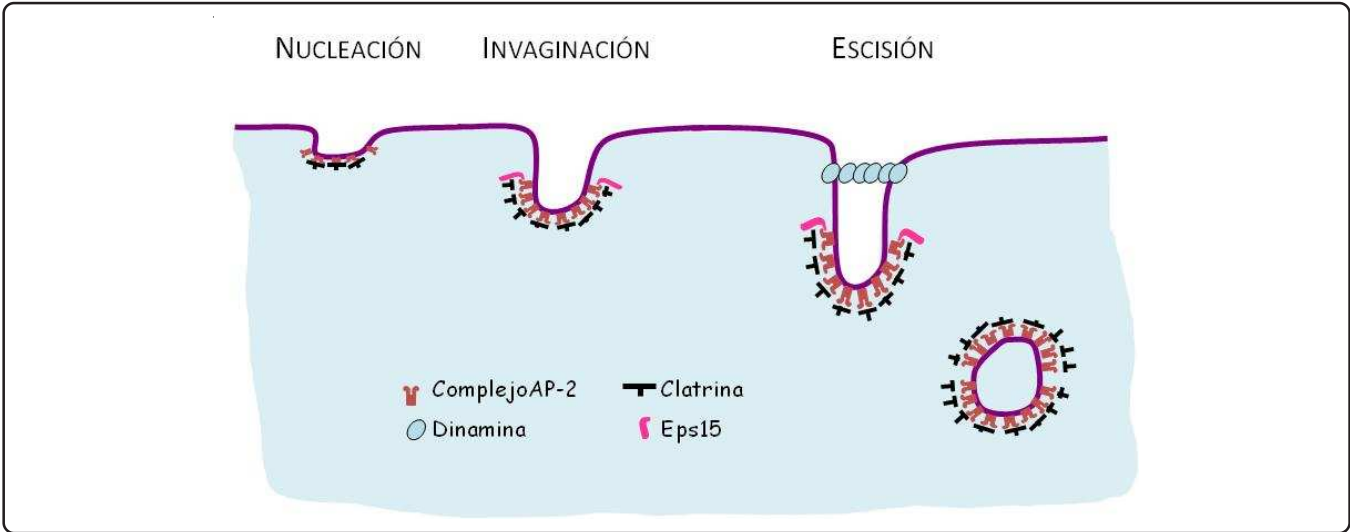


Figura 2. Formación de las vesículas de clatrina. Se muestran los pasos secuenciales involucrados en la endocitosis mediada por clatrina y algunos de los componentes claves que participan en cada etapa.

Vía	Inhibidor	Efecto	Observaciones
Dependiente de Clatrina	Clorpromazina	Inhibe el ensamble de la malla de clatrina ⁴³	Puede afectar la fluidez y permeabilidad de la membrana ⁴⁴
	Medio sin potasio/con sacarosa	Polimerización anormal de clatrina. Remueve las vesículas cubiertas de la membrana ^{45,46}	La disminución de potasio en el medio puede tener otros efectos como la inhibición del transporte de proteínas secretoras ⁴⁷
	Mutantes dominantes negativas de eps15	Evita el reclutamiento de AP-2 a la membrana celular, inhibiendo la formación de la malla de clatrina ⁴⁸	No inhibe aquellas vesículas con cubierta de clatrina que no dependen del complejo AP-2 ⁴⁹
	siRNAs cadena pesada de clatrina	Inhiben específicamente la expresión de clatrina ⁴³	
Dependiente de Caveola	Ciclodextrina	Secuestra el colesterol de la membrana ³⁹	Puede provocar efectos no específicos ⁵⁰
	Mutante dominante negativa de caveolina	Inhibe la asociación de la caveolina a las balsas lipídicas ⁵¹	
	siRNAs caveolina	Inhibe específicamente la expresión de caveolina ³⁹	
Macropinocitosis	Citocalasina D	Previene la polimerización de actina ^{52,53}	Puede inhibir la entrada de moléculas que entran por otras rutas de endocitosis ⁵⁴
	Amilorida	Inhibe intercambiadores Na ⁺ /H ⁺ ¹³	Inespecífico ⁵⁵
	Toxina B de <i>C. difficile</i>	Inhibe a las GTPasas Rac, Cdc42 y Rho ⁵⁶	Las Rho GTPasas pueden participar en otras vías ^{15,17}

Tabla 1. Estrategias usadas para el estudio de los distintos componentes y vías de la endocitosis.

proteínas accesorias para ser reclutada a la membrana, las caveolinas son proteínas integrales que están asociadas a microdominios en la membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos también llamados balsas lipídicas⁶. La formación de la caveola depende de la expresión de caveolina-1 en células no musculares y de caveolina-3 en células de músculo⁶. Estas proteínas forman oligómeros que cubren las vesículas, las cuales son liberadas de la membrana plasmática, a través de la acción de dinamina, a estructuras llamadas caveosomas presentes en el interior de la célula (Figura 1)⁷. La ausencia de marcadores para endosomas tempranos, tardíos y de reciclaje indica que estas estructuras representan un nuevo tipo de organelos⁷. A diferencia de los endosomas, estos organelos tienen pH neutro.

El tratamiento de las células con genisteína, un inhibidor de tirosín cinasas extraído de la soya, bloquea la invaginación de las caveolas⁸. Se sabe que la cinasa Src fosforila a la caveolina-1 en la tirosina 14 y esto incrementa la dinámica de las caveolas. En la Tabla I se muestran otras maneras diferentes para inhibir esta vía.

Macropinocitosis

A diferencia de las otras vías de endocitosis, la macropinocitosis involucra la remodelación de grandes extensiones de la membrana plasmática a través de cambios en el citoesqueleto de actina lo que culmina con la internalización de fluido en grandes vacuolas llamadas macropinosomas (Figura 1)^{9,10}. Éste es un proceso transitorio comúnmente inducido por factores de crecimiento que activan receptores de tirosín cinasas promoviendo cascadas de señalización que inducen cambios en el citoesqueleto de actina y en la membrana plasmática.

Entre las proteínas involucradas en el proceso de regulación de la macropinocitosis se encuentran las GTPasas Rac y Cdc42 las cuales activan a la cinasa PAK1 encargada de regular la dinámica del citoesqueleto de actina¹¹. Además, PAK1, cinasa que fosforila serinas y treoninas, activa a la proteína CtBP1 que es necesaria para que se cierre el macropinosoma¹². La inhibición de los intercambiadores Na^+/H^+ por amilorida o derivados de ésta, bloquean esta vía¹³. Además, agentes que alteran la polimerización del citoesqueleto de actina y mutantes dominantes negativos de Rac, Cdc42 o PAK1, también afectan este mecanismo de endocitosis^{13,14}. Es importante mencionar que estas proteínas tienen otras funciones en la célula y es necesario combinar estrategias experimentales para asegurar que el cargo en particular que se está estudiando utiliza esta vía de entrada (Tabla I).

Endocitosis independiente de clatrina y caveolina

Algunas vías de endocitosis han sido parcialmente caracterizadas recientemente y se han observado que son independientes tanto de clatrina como de caveolina y, sin embargo, pueden o no depender de dinamina¹.

Por ejemplo, la internalización del receptor de la interleucina 2 (IL-

2) se caracteriza por su independencia a clatrina y caveolina, su dependencia a dinamina y a colesterol. Además, el uso de mutantes dominantes negativos de la GTPasa RhoA, encargada de la remodelación del citoesqueleto de actina, demostró que esta vía está regulada por esta enzima¹⁵. La endocitosis del receptor de citocinas γc , que requiere de la polimerización de actina, también se lleva a cabo de esta manera¹⁶.

Un ejemplo de cargos que entran por una vía independiente de dinamina son las proteínas ancladas a glicosil-inositol-fosfato (GPI). En general, las proteínas ancladas a GPI entran a la célula por esta vía y son dirigidas a compartimentos endosomales tempranos enriquecidos en proteínas ancladas a GPI, GEECs (por sus siglas en inglés de GPI-AP enriched early endosomal compartments)¹⁷. Los GEECs son compartimentos endosomales distintos, que no colocalizan con caveolina. La inhibición de la endocitosis mediada por clatrina, y el uso de mutantes de dinamina, no inhiben la internalización de estas proteínas. La expresión de una dominante negativa de la GTPasa cdc42 sí inhibe esta vía¹⁷.

A principios del 2006, Glebov *et al.*, encontraron que flotilina-1, una proteína marcadora de balsas lipídicas, participa en una nueva vía de endocitosis (Figura 1)¹⁸. Esta novedosa ruta fue caracterizada por la internalización de proteínas asociadas a glicosilfosfatidilinositol (específicamente, CD59-GPI). Estos investigadores encontraron que estas proteínas entran a la célula a través de una vía que es dependiente de flotilina pero independiente de clatrina, caveolina y dinamina¹⁸. Por otro lado, Payne *et al.*, mediante el uso de drogas, RNAi y la expresión transitoria de proteínas descubrieron que la entrada de los proteoglicanos es independiente de clatrina y caveolina pero dependiente de flotilina y dinamina¹⁹. Además, encontraron que estas moléculas y sus ligandos entran directamente a los endosomas tardíos dado que los complejos (proteoglicanos y sus ligandos catiónicos) colocalizan con Rab9 pero no con Rab5¹⁹.

Endocitosis como vía de entrada de virus

Los virus son parásitos intracelulares obligatorios formados por una cubierta proteica (cápside) que rodea el material genético. Algunos virus tienen además, una envoltura lipídica proveniente de la célula que infectó previamente rodeando su cápside. El ciclo replicativo de cualquier virus comienza con la unión de éste a sus receptores (entre ellos integrinas, gangliósidos, glicoproteínas, etc.) lo cual provoca cambios en la partícula viral que favorecen las siguientes etapas. Una vez que el virus ha reconocido a sus receptores, el siguiente paso es la penetración de la membrana celular. Este paso puede darse a nivel de la membrana plasmática o en membranas intracelulares de diferentes organelos dependiendo de los requerimientos de cada virus. Muchos virus utilizan las vías de endocitosis para entrar a la célula, mientras que pocos atraviesan directamente la membrana celular por un mecanismo llamado penetración

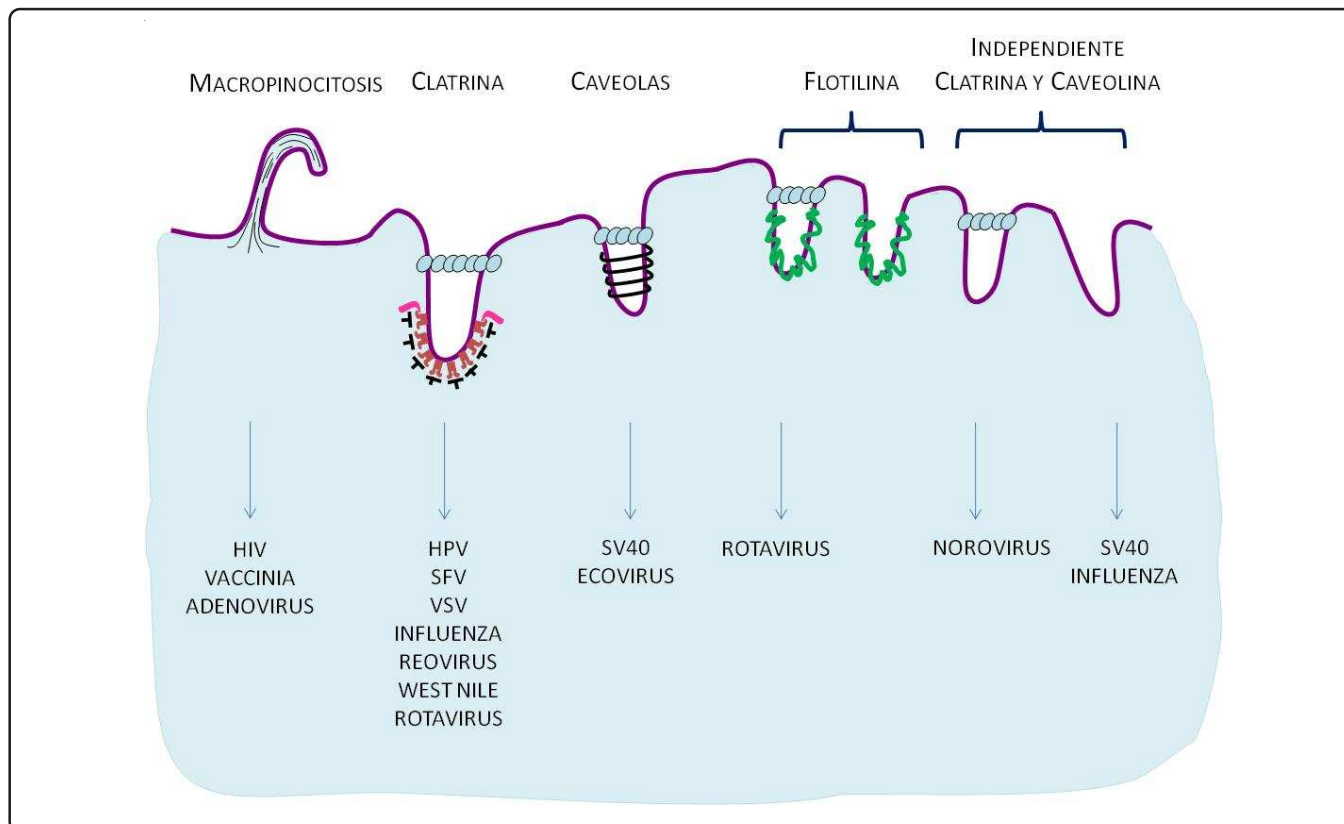


Figura 3. Se muestran las distintas vías de endocitosis y los virus que utilizan cada una de éstas. Ejemplos de virus que entran por macropinocitosis son: VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), vaccinia y algunos serotipos de adenovirus. Dentro de los virus que entran por una vía dependiente de clatrina están: VPH (virus del papiloma humano), VSV (virus de la estomatitis vesicular), reovirus, influenza y algunas cepas de rotavirus. SV40 (virus de simio que produce vacuolas 40) y ecovirus son representantes de la endocitosis mediada por caveolas, mientras que la cepa de simio RRV de rotavirus entra a la célula por una vía independiente de clatrina y caveolina pero dependiente de flotilina y dinamina. Recientemente, se encontró que norovirus usa una vía independiente de clatrina, caveolina y flotilina pero dependiente de colesterol y dinamina. Finalmente, se ha reportado que influenza y SV40 también utilizan una vía independiente de clatrina, caveolina y dinamina.

directa (Figura 3). Cabe señalar que la jornada de un virus no termina cuando llega al interior de la célula, a partir de ese momento, la partícula viral requiere desnudarse, es decir, liberar el genoma viral para que pueda ser replicado o traducido. Finalmente, las proteínas virales se ensamblan para generar nuevas partículas virales que salen de la célula y son capaces de infectar a otras células.

En esta revisión nos enfocaremos a la entrada viral que es la primera etapa del ciclo replicativo de un virus. Específicamente, nos referiremos a las distintas rutas endocíticas que utilizan los virus para ingresar a la célula. Esta fase inicia desde que el virus se une a sus receptores celulares hasta que llega a su sitio de replicación, el cual puede ser desde el citoplasma hasta el núcleo. Este proceso involucra varios pasos (unión, penetración y desnudamiento de la partícula viral) y en el que es necesaria una cápside metaestable que, por un lado, sea resistente para sobrevivir en ambientes extracelulares y que, por otro lado, sea fácil de desensamblarse una vez llegado al sitio apropiado de replicación para liberar su material genético.

La entrada de un virus utilizando el proceso endocítico de la célula le da varias ventajas. Primero, evita la barrera del citoesqueleto de actina cortical que se encuentra inmediatamente debajo de la membrana plasmática y forma una malla difícil de atravesar. Y por otra parte, le da acceso a los organelos endocíticos los cuales proveen de micro-ambientes que favorecen la penetración viral. Las proteasas endosomales o el bajo pH de estos organelos son algunos de los recursos más usados por los virus para facilitar procesos tales como el desnudamiento de la partícula.

¿Cómo se puede estudiar la entrada de los virus?

Es posible ver directamente a los virus mediante el microscopio electrónico o a través de microscopía de fluorescencia y se puede evaluar el papel de la inhibición de alguna vía de endocitosis en particular sobre la entrada del virus. Es factible marcar la envoltura, las proteínas o el genoma viral con compuestos fluorescentes lo que permite seguir a los virus así marcados durante su entrada en células vivas. Sin embargo, uno de los problemas que hay con este tipo de enfoque es que no es posible distinguir cuáles de las

partículas virales que entran a la célula son infecciosas y, por lo tanto, dan una infección productiva y cuáles no son infecciosas, por lo que no llevan a cabo una infección productiva. Éste no es un problema menor, ya que normalmente hay un gran número de partículas virales que no son "funcionales", este número puede llegar a ser como de 1:100 ó 1:10,000 donde hay una partícula infecciosa por cada cien o hasta diez mil partículas que son defectuosas. Al observar estas partículas por microscopía no es posible distinguirlas y, por consiguiente, no es posible determinar sólo con este método la vía de entrada productiva que utiliza un determinado virus.

Otra manera que permite evitar este problema es evaluar el efecto que tienen los inhibidores de endocitosis sobre la producción de proteína viral o sobre la replicación del genoma viral. Éste es el enfoque más usado en virus cuya proporción de partículas físicas *versus* infecciosas es alta, ya que permite estar más seguro de que se está determinando la vía de endocitosis que usan las partículas infecciosas.

Existen varios ejemplos de virus que utilizan las diferentes rutas de endocitosis para ingresar a la célula y a continuación daremos una breve descripción de los ejemplos más conocidos.

Endocitosis mediada por clatrina: mecanismo muy socorrido por los virus

La endocitosis mediada por clatrina es uno de los mecanismos más utilizados entre los virus (Figura 3). Esta vía es utilizada por virus de diferentes familias como son el virus de la estomatitis vesicular, papilomavirus y el virus del Nilo, entre otros²⁰⁻²². Virus de gran impacto médico como son el de influenza o el del dengue también entran a la célula por este mecanismo^{23,24}. En general, las moléculas -incluidos los virus- que entran a la célula por endocitosis mediada por clatrina están expuestas al ambiente ácido de los endosomas y pueden responder al bajo pH sufriendo cambios conformacionales. En el caso de los virus, estos cambios conformacionales permiten la exposición de péptidos de fusión los cuales a su vez interactúan con la membrana del endosoma facilitando su liberación al citosol. Dependiendo del pH que se requiera para provocar el cambio conformacional, el sitio de penetración de los virus puede ser los endosomas tempranos (que tienen un pH 6.5 a 6.0), tardíos (pH 6.0 a 5.5) e inclusive los lisosomas (pH 5.5 a 4). Un ejemplo de un virus que sufre una fusión catalizada por un ambiente ácido es el virus de influenza. En la superficie celular, el virus se une a receptores que tienen ácido siálico a través de las cabezas globulares de la glicoproteína viral hemaglutinina (HA). El virus es entonces internalizado vía la endocitosis mediada por clatrina y el bajo pH de los endosomas tardíos provoca cambios conformacionales en las cabezas globulares de la proteína HA. Esto expone al péptido de fusión el cual es una región altamente hidrofóbica de la proteína. Además, estos cambios lo acercan a la membrana del endosoma con lo cual la fusión de la membrana viral con la endosomal se puede llevar a cabo y el genoma viral es liberado

al citoplasma. Si los cambios conformacionales se inducen antes de que el virus sea internalizado, mediante un tratamiento de las partículas virales con pH ácido, por ejemplo, el virus se inactiva y pierde su infectividad²⁵.

Por otro lado, en algunos casos el pH ácido no es suficiente para inducir algún cambio conformacional necesario para facilitar la fusión de la partícula viral con el endosoma. Se ha reportado que algunos virus son activados a través de cortes proteolíticos que son llevados a cabo por proteasas endosomales, como las catepsinas (que son proteasas cuya actividad depende de pH). En este caso el pH endosomal es necesario para activar a la proteasa endosomal que al cortar alguna proteína viral promueve el cambio conformacional de la partícula viral, lo que favorece a su vez la penetración al citoplasma celular^{26,27}.

Endocitosis mediada por caveolas

Existen varios virus que pueden entrar por la ruta dependiente de caveolina como son el virus de la leucemia murina, ecovirus y SV40, entre otros (Figura 3)²⁸⁻³⁰.

En el caso de SV40, un virus de DNA que tiene el potencial de causar tumores, su infectividad se ve disminuida cuando se trata a las células con drogas como la nistatina, que inhiben esta vía²⁸. Asimismo, la expresión de una mutante dominante negativa de dinamina (defectuosa en su actividad de GTPasa) inhibe la entrada de este virus⁸, lo que sugiere que SV40 entra a la célula por una vía dependiente de caveolina y dinamina. Continuando la caracterización de la vía de entrada, Pelkmans *et al.*, demostraron que inhibidores de tirosín cinasas como la genisteína bloquean la internalización de este virus⁸. Además, SV40 requiere un citoesqueleto de actina dinámico dado que inhibidores de la polimerización de actina afectan su infectividad⁸. La ruta de entrada de SV40 es bastante inusual, este virus después de ser internalizado por la vía dependiente de las caveolas es llevado a organelos celulares neutros llamados caveosomas (Figura 1) y de ahí es transportado al retículo endoplasmático donde la partícula viral es desensamblada por enzimas de la maquinaria del plegamiento de proteínas^{31,32}. Al ser un virus de DNA, el sitio de replicación de este virus es el núcleo de la célula. Aún se desconoce el mecanismo que utiliza este virus para llegar hasta este organelo.

Macropinocitosis

Recientemente, Mercer *et al.*, encontraron que vaccinia, un virus de DNA envuelto que es responsable de la viruela en las vacas y que se replica en el citosol, entra por macropinocitosis (Figura 3). En este trabajo, siguieron la entrada de vaccinia usando tanto partículas virales como proteínas celulares marcadas con fluoróforos y mostraron que este virus se asocia a filopodios, estructuras tipo dedo formadas por el citoesqueleto de actina que se proyectan del cuerpo de la célula. Siguiendo el paso de vaccinia, los autores vieron que este virus utiliza este tipo de estructuras para acercarse al

cuerpo de la célula y una vez en la membrana plasmática, el virus es literalmente engullido. Inhibidores del citoesqueleto de actina, tratamientos con amilorida que es un inhibidor de los intercambiadores Na^+/H^+ y mutantes dominantes negativas de Rac1 y PAK1 reducen la infección¹⁴.

Otros virus como adenovirus, virus de DNA no envueltos que infectan principalmente las vías respiratorias, también utilizan la macropinocitosis para entrar a la célula. La unión de estos virus a su receptor activa Rac1, además, microscopías electrónicas muestran que el virus se asocia a vacuolas grandes y sin cubierta. Inhibidores del citoesqueleto de actina y de los intercambiadores Na^+/H^+ bloquean la infección; el virus también activa CtBP1 para cerrar los macropinosomas con adenovirus en ellos³³. En el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), un virus envuelto con genoma de RNA, se ha reportado que entra por diferentes vías dependiendo del tipo de célula. Sin embargo, la macropinocitosis ha sido sugerida como su mecanismo de entrada en los macrófagos humanos³⁴. Esta observación se sustenta en la presencia del virus detectada por microscopía electrónica en macropinosomas y la inhibición de su entrada por drogas que evitan la formación de ruffles (extensiones de membrana generadas por la remodelación del citoesqueleto de actina), tales como amilorida³⁴.

Endocitosis independiente de clatrina y caveolina

En el caso de virus internalizados por un mecanismo independiente de clatrina y caveolina pero dependiente de dinamina se encuentra rotavirus, un virus causante de diarrea severa en niños menores de 2 años. Este virus no envuelto está formado por tres capas concéntricas de proteína. La capa más externa tiene un papel muy importante en la infectividad viral, ya que está involucrada tanto en la unión como en la entrada de rotavirus.

Para entrar a la célula, los rotavirus requieren de varios pasos³⁵. El primero, es su activación por tripsina. Una vez activado, el virus se une a la célula blanco a través del reconocimiento de receptores presentes en la superficie celular. La presencia de dichos receptores determina en gran medida qué tipo celular puede infectar un virus. Se sabe que para los rotavirus, el ácido siálico, las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \chi \beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$ y la proteína de choque térmico Hsc70 están involucradas como sus receptores³⁵. En la entrada de rotavirus a la célula se ha sugerido la participación de los microdominios lipídicos (también conocidos como balsas lipídicas), ya que hay una severa disminución en la infectividad al remover el colesterol de la membrana (lo que resulta en la desestabilización de las balsas lipídicas)^{36,37}. La presencia de las subunidades de integrina $\alpha 2$ y $\beta 3$, de la proteína Hsc70, así como de las partículas virales infecciosas en balsas lipídicas, apoyan la idea de que éstas son importantes en la entrada de rotavirus³⁸. Con respecto al mecanismo de entrada, se ha demostrado mediante el uso de drogas y de dominantes negativas (de eps15, caveolina-1 y dinamina-2), que la entrada de la cepa de rotavirus RRV es independiente tanto de la endocitosis mediada por

clatrina como la de caveolina y, sin embargo, depende de dinamina, una proteína involucrada en la liberación de la vesícula de la membrana plasmática³⁷. Estudios recientes sugieren que esta cepa de rotavirus pudiera estar utilizando una vía dependiente de flotilina y dinamina para entrar (Gutiérrez, M. *et al.*, resultados sin publicar).

A inicios de este año, se reportó que el norovirus murino 1, un virus causante de gastroenteritis, entra por una vía independiente de clatrina, caveolina y flotilina pero dependiente de colesterol y dinamina (Figura 3)³⁹. Mediante el uso de agentes químicos y mutantes dominantes negativas también fue excluida la macropinocitosis como mecanismo de entrada para este virus.

Los virus pueden entrar a la célula utilizando diferentes rutas

Inicialmente se pensó que cada familia de virus utilizaba una sola vía de entrada para infectar diferentes tipos celulares. Sin embargo, cada vez hay más evidencia de que un mismo tipo de virus puede entrar por diferentes mecanismos dependiendo del tipo celular^{40,41}.

Como se mencionó anteriormente, el representante típico de la endocitosis mediada por clatrina es el virus de influenza²⁴. Sin embargo, se ha encontrado que en células HeLa este virus no es afectado por drogas o mutantes dominantes negativas que inhiben tanto las vías de endocitosis mediadas por clatrina, como las mediadas por caveolina, sugiriendo qué influenza puede entrar también por una vía independiente de clatrina y dinamina (Figura 3)⁴¹. Virus que entran por endocitosis mediada por caveolas como SV40 también pueden tener otras vías de entrada³¹. En el 2005, Damm *et al.*, demostraron que este virus puede entrar en células sin caveolina y utilizar una vía que es independiente tanto de caveolina como de clatrina y de dinamina (Figura 3)⁴⁰. A pesar de utilizar diferentes mecanismos de endocitosis para ser internalizado, SV40 mantiene su dependencia por el colesterol y el requerimiento por las cinasas de tirosina en ambas vías de entrada^{31,40}.

Por otro lado, se ha encontrado que cepas de rotavirus que presentan diferentes requerimientos por los receptores de membrana podrían entrar por distintas vías endocíticas (Gutiérrez, M. *et al.*, resultados sin publicar). En este trabajo, se evaluó el papel de las vías de endocitosis mejor caracterizadas (la dependiente de clatrina, de caveolina y la macropinocitosis) en la entrada de varias cepas mediante el uso de agentes químicos, siRNAs y mutantes dominantes negativas. Además, se determinó la dependencia del proceso de entrada por el pH endosomal. Los resultados obtenidos muestran que sin importar las interacciones con los receptores, las cepas pueden entrar por vías distintas entre ellas la endocitosis mediada por clatrina y/o la dependiente de flotilina (Gutiérrez, M. *et al.*, resultados sin publicar).

CONCLUSIONES

Debido a su tamaño (que puede ser 100,000 veces más pequeño que una célula), los virus dependen de toda la maquinaria celular para su replicación y, por lo tanto, han desarrollado estrategias para aprovechar al máximo los recursos de su huésped. Es por esto que la caracterización del ciclo replicativo de los virus representa una fuente de conocimiento sin precedentes.

A través de la caracterización de las rutas de entrada de los virus, éstos han contribuido enormemente a la comprensión del funcionamiento de la célula. Varias de las vías de endocitosis aquí descritas se descubrieron gracias al estudio de los mecanismos de entrada utilizados por los virus. Detalles de la formación de las vesículas cubiertas por clatrina han sido descubiertos usando virus como reovirus, influenza y dengue^{23,24,42}.

En sí mismos estos agentes infecciosos son fascinantes pero a la vez, su alta adaptabilidad y especificidad por el tipo celular que infectan, los hacen una herramienta molecular muy útil.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por las becas 55005515 del Instituto Médico Howard Hughes, IN210807 de DGAPA-UNAM, y la 60025 de CONACyT. Michelle Gutiérrez es becaria de CONACyT.

REFERENCIAS

1. Mayor, S. & Pagano, R.E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 603-612 (2007).
2. Marsh, M. & Helenius, A. Virus entry: open sesame. *Cell* **124**, 729-740 (2006).
3. Royle, S.J. The cellular functions of clathrin. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 1823-1832 (2006).
4. Traub, L.M. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 583-596 (2009).
5. Takei, K. & Haucke, V. Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol.* **11**, 385-391 (2001).
6. Krajewska, W.M. & Maslowska, I. Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell Mol. Biol. Lett.* **9**, 195-220 (2004).
7. Pelkmans, L. Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim. Biophys. Acta* **1746**, 295-304 (2005).
8. Pelkmans, L., Puntener, D., & Helenius, A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**, 535-539 (2002).
9. Mercer, J. & Helenius, A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 510-520 (2009).
10. Kerr, M.C. & Teasdale, R.D. Defining macropinocytosis. *Traffic* **10**, 364-371 (2009).
11. Tkachenko, E., Lutgens, E., Stan, R.V., & Simons, M. Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway. *J. Cell Sci.* **117**, 3189-3199 (2004).
12. Liberali, P. *et al.* The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *EMBO J.* **27**, 970-981 (2008).
13. Koivusalo, M. *et al.* Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J. Cell Biol.* **188**, 547-563 (2010).
14. Mercer, J. & Helenius, A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**, 531-535 (2008).
15. Lamaze, C. *et al.* Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell* **7**, 661-671 (2001).
16. Sauvonnnet, N., Dujancourt, A., & Dautry-Varsat, A. Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammacytokine receptor. *J. Cell Biol.* **168**, 155-163 (2005).
17. Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R.G., & Mayor, S. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev. Cell* **2**, 411-423 (2002).
18. Glebov, O.O., Bright, N.A., & Nichols, B.J. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* **8**, 46-54 (2006).
19. Payne, C.K., Jones, S.A., Chen, C., & Zhuang, X. Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. *Traffic* **8**, 389-401 (2007).
20. Chu, J.J. & Ng, M.L. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J. Virol.* **78**, 10543-10555 (2004).
21. Day, P.M., Lowy, D.R., & Schiller, J.T. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* **307**, 1-11 (2003).
22. Sun, X., Yau, V.K., Briggs, B.J., & Whittaker, G.R. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* **338**, 53-60 (2005).
23. Van der Schaar, H.M. *et al.* Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS. Pathog.* **4**, e1000244 (2008).
24. Rust, M.J., Lakadamyali, M., Zhang, F., & Zhuang, X. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 567-573 (2004).
25. Puri, A., Booy, F.P., Doms, R.W., White, J.M., & Blumenthal, R. Conformational changes and fusion activity of influenza virus hemagglutinin of the H2 and H3 subtypes: effects of acid pretreatment. *J. Virol.* **64**, 3824-3832 (1990).
26. Chandran, K., Sullivan, N.J., Felbor, U., Whelan, S.P., & Cunningham, J.M. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* **308**, 1643-1645 (2005).
27. Ebert, D.H., Deussing, J., Peters, C., & Dermody, T.S. Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 24609-24617 (2002).
28. Anderson, H.A., Chen, Y., & Norkin, L.C. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1825-1834 (1996).
29. Beer, C., Andersen, D.S., Rojek, A., & Pedersen, L. Caveola-dependent endocytic entry of amphotropic murine leukemia virus. *J. Virol.* **79**, 10776-10787 (2005).
30. Marjomaki, V. *et al.* Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J. Virol.* **76**, 1856-1865 (2002).
31. Pelkmans, L., Kartenbeck, J., & Helenius, A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* **3**, 473-483 (2001).

32. Schelhaas, M. *et al.* Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* **131**, 516-529 (2007).
33. Amstutz, B. *et al.* Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *EMBO J.* **27**, 956-969 (2008).
34. Marechal, V. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J. Virol.* **75**, 11166-11177 (2001).
35. Isa, P., Gutiérrez, M., Arias, C.F., & López, S. Rotavirus cell entry. *Future Virology* **3**, 135-146 (2008).
36. Guerrero, C.A., Zarate, S., Corkidi, G., López, S., & Arias, C.F. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* **74**, 9362-9371 (2000).
37. Sánchez-San Martín, C., López, T., Arias, C.F., & López, S. Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* **78**, 2310-2318 (2004).
38. Isa, P., Realpe, M., Romero, P., López, S., & Arias, C.F. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* **322**, 370-381 (2004).
39. Perry, J.W. & Wobus, C.E. Endocytosis of Murine Norovirus 1 (MNV-1) into murine macrophages is dependent on dynamin II and cholesterol. *J. Virol.* (2010).
40. Damm, E.M. *et al.* Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.* **168**, 477-488 (2005).
41. Sieczkarski, S.B. & Whittaker, G.R. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **76**, 10455-10464 (2002).
42. Ehrlich, M. *et al.* Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* **118**, 591-605 (2004).
43. Blanchard, E. *et al.* Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **80**, 6964-6972 (2006).
44. Maruoka, N. *et al.* Effects of chlorpromazine on plasma membrane permeability and fluidity in the rat brain: A dynamic positron autoradiography and fluorescence polarization study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **31**, 178-186 (2007).
45. Hansen, S.H., Sandvig, K., & van Deurs, B. Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J. Cell Biol.* **121**, 61-72 (1993).
46. Heuser, J.E. & Anderson, R.G. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.* **108**, 389-400 (1989).
47. Judah, J.D., Howell, K.E., Taylor, J.A., & Quinn, P.S. Potassium depletion inhibits the intracellular transport of secretory proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *J. Cell Sci.* **92** (Pt 2), 173-185 (1989).
48. Benmerah, A., Bayrou, M., Cerf-Bensussan, N., & Dautry-Varsat, A. Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J. Cell Sci.* **112** (Pt 9), 1303-1311 (1999).
49. Motley, A., Bright, N.A., Seaman, M.N., & Robinson, M.S. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J. Cell Biol.* **162**, 909-918 (2003).
50. Subtil, A. *et al.* Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 6775-6780 (1999).
51. Trouet, D., Hermans, D., Droogmans, G., Nilius, B., & Eggermont, J. Inhibition of volume-regulated anion channels by dominant-negative caveolin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 461-465 (2001).
52. Peterson, J.R. & Mitchison, T.J. Small molecules, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chem. Biol.* **9**, 1275-1285 (2002).
53. Spector, I., Braet, F., Shochet, N.R., & Bubb, M.R. New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc. Res. Tech.* **47**, 18-37 (1999).
54. Misinzo, G. *et al.* Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J. Gen. Virol.* **86**, 2057-2068 (2005).
55. García, M.L. *et al.* Amiloride analogs inhibit L-type calcium channels and display calcium entry blocker activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 3763-3771 (1990).
56. Genth, H., Dreger, S.C., Huelsenbeck, J., & Just, I. Clostridium difficile toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 592-597 (2008).