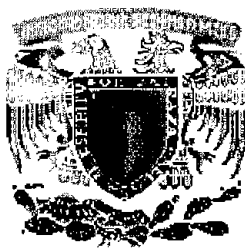


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE CIENCIAS

“Revisión acerca de algunos aspectos fundamentales
en la entrada de los rotavirus a las células en cultivo
y el posible papel de la actina en el proceso”

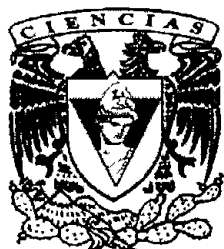
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

ALEJANDRO SÁNCHEZ GONZÁLEZ



DIRECTORA DE TESIS: DRA. CLAUDIA SÁNCHEZ SANMARTIN

2005

M.340267





Universidad Nacional
Autónoma de México

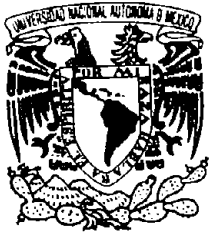


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alejandro Sánchez González
FECHA: 24 / 1 / 05
FIRMA: [Signature]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Revisión acerca de algunos aspectos fundamentales en la entrada de los rotavirus a las células en cultivo y el posible papel de la actina en el proceso"
realizado por

Alejandro Sánchez González

con número de cuenta 9714544-8 , quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Claudia Sánchez SanMartín

Propietario

Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo

Propietario

Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Suplente

Dr. Ernesto Méndez Salinas

Suplente

Dr. Pavel Isa Haspra

[Handwritten signatures of Claudia Sánchez SanMartín, Patricia Ileana Joseph Bravo, Lorenzo Segovia Forcella, Ernesto Méndez Salinas, and Pavel Isa Haspra]

Consejo Departamental de Biología

M. En C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de los Dres. Carlos Arias Ortiz y Susana López Charretón, bajo la supervisión de la Dra. Claudia Sánchez Sanmartín en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México ubicado en Cuernavaca Morelos, como parte de las actividades del taller “Biología de las Macromoléculas: Nuevas implicaciones y paradigmas” a cargo de los Dres. Patricia Joseph Bravo y José Luis Puente García.

A mis padres:

Antonio Sánchez Pérez y Amelia González Medina

Por su amor, cariño, comprensión y apoyo.

A mis hermanos:

Luis Antonio y Erika Lizbeth

Con todo mi cariño y respeto

Agradecimientos:

Son muchas las personas que a lo largo de mi vida han influido de alguna forma u otra para llegar a este punto y a todas ellas muchas gracias.

En primer lugar agradezco a mis padres Antonio Sánchez Pérez y Amelia González Medina por su amor, apoyo, comprensión e impulso por siempre seguir adelante, los amo y esto también es suyo. A mis hermanos Luis Antonio y Erika Lizbeth Sánchez González, gracias por siempre ser un ejemplo y un brazo en el cuál apoyarme para seguir adelante, para ustedes todo mi cariño y respeto.

Agradezco a los Dres. Patricia Joseph Bravo y José Luis Puente García por haberme brindado la oportunidad mediante su taller de entrar al Instituto de Biotecnología de gran importancia en mi vida académica. Así como al Dr. Lorenzo Segovia Forcella por su disposición a ayudar y sus valiosos comentarios.

A los Dres. Carlos Arias Ortiz y Susana López Charretón por permitirme trabajar en su laboratorio y aprender de todas las excelentes personas que lo componen. A los Dres. Pavel, Ernesto y Tomas por sus excelentes comentarios y sugerencias. A todos mis compañeros del laboratorio por el apoyo y ayuda, a los técnicos, Rafa muchas gracias por tu disposición para ayudar y soporte, “Don Peter” gracias por su ayuda, comentarios y por hacer muy amena mi estancia en el laboratorio. A todos ustedes muchas gracias. Pero en particular quiero agradecer a la Dra. Claudia Sánchez Sanmartín por sus enseñanzas, paciencia, apoyo y comentarios en todo momento.

A todos mis compañeros del taller y de la facultad, por permitirme compartir momentos muy gratos con ustedes así como por su constante apoyo, no los olvidaré.

A la Dra. Angélica Olivo Díaz por permitirme tener contacto inicial con la ciencia en su laboratorio.

Al Dr. Raúl Mancilla Jiménez por su confianza y apoyo para que continúe en este increíble mundo de la ciencia, así como a los integrantes de éste “mi” nuevo laboratorio, Patricia Espinoza, Ismael Ramírez, Maritrini Colón (“quasi”integrante) por su apoyo, enseñanza y amistad y a mi amigo de siempre Miguel Ángel Esparza Cerón gracias por tu apoyo y amistad.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	
	Los rotavirus.....	8
	La partícula viral.....	8
	Proteínas estructurales.....	9
	Interacción virus-célula.....	11
	Unión de los rotavirus a las células.....	12
	Entrada de los rotavirus a las células.....	16
	Papel de la dinamina en la endocitosis.....	19
	Interacciones de la dinamina con el citoesqueleto.....	22
	Estudio de la dinámica del citoesqueleto celular.....	28
	Relación de citoesqueleto celular con la infección por rotavirus.....	30
II.	HIPÓTESIS	
	Hipótesis.....	32
III.	OBJETIVOS	
	General y Particulares.....	33
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	
	Virus.....	34
	Cultivo celular.....	34
	Lisado viral.....	34
	Infección con RRV.....	35
	Inmunofluorescencia.....	35
	Tratamiento con citocalasina D.....	36
	Microscopia.....	37

V.	RESULTADOS	
	Detección de los patrones de actina en las células MA104 en cultivo por la técnica de inmunofluorescencia.....	38
	Patrones de actina en células MA104 infectadas con el virus RRV a diferentes tiempos.....	40
	Tratamiento de las células con citocalacina D a diferentes tiempos.....	45
	Efecto de la infección por rotavirus en células MA104 tratadas con citocalacina D.....	49
VI.	DISCUSIÓN	
	Discusión.....	52
VII.	CONCLUSIONES	
	Conclusiones.....	55
VIII.	PERSPECTIVAS	
	Perspectivas.....	57
IX.	BIBLIOGRAFÍA	
	Bibliografía.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

1. La partícula del rotavirus.....	10
2. Esquema de la proteína VP4.....	11
3. El ciclo de infección de los rotavirus.....	12
4. Modelo de unión de rotavirus a su célula blanco.....	15
5. Representación esquemática de la dinamina.....	19
6. Vías en las que se encuentra implicada la dinamina.....	20
7. Proteínas que interaccionan con la dinamina.....	23
8. Interacción entre la dinamina-proteínas implicadas en la endocitosis.....	25
9. Interacción entre la dinamina-proteínas asociadas al citoesqueleto.....	27
10. Dinámica de la formación de los filamentos de actina y el efecto de la citocalasina D.....	29
11. Patrones de actina en células MA104 en cultivo.....	39
12. Efecto de la infección por rotavirus a los 0, 15 y 30 minutos sobre los patrones de actina en células MA104.....	41
13. Efecto de la infección por rotavirus a los 45, 60 minutos y 6 horas sobre los patrones de actina en células MA104.....	42
14. Microscopia confocal de células MA104 infectadas con RRV.....	44
15. Células MA104 tratadas con citocalacina D por 1 hora.....	46
16. Células MA104 tratadas con citocalacina D por 2 horas.....	47
17. Células MA104 tratadas con citocalacina D por 3 horas.....	48
18. Efecto de la infección por rotavirus a los 0, 15 y 30 minutos sobre la actina celular en células tratadas con citocalacina D.....	50
19. Efecto de la infección por rotavirus a los 45, 60 minutos y 6 horas sobre la actina celular en células tratadas con citocalacina D.....	51

Introducción

Los rotavirus

En 1973, Bishop y colaboradores al observar biopsias de intestino delgado provenientes de niños que padecían diarrea deshidratante severa, encontraron unas partículas virales que al ser observadas al microscopio electrónico presentaban una morfología característica similar a una rueda de carreta, de aquí que a estas partículas se les denominara rotavirus, del latín “*rota*” que significa rueda.

Los rotavirus son considerados en la actualidad como el principal agente causante de diarreas severas en niños menores de 5 años, ocasionando alrededor de 600,000 muertes al año tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (World Health Organization 2004).

La partícula viral

Los rotavirus han sido clasificados como uno de los ocho géneros de virus pertenecientes a la familia *Reoviridae*, son virus sin envoltura lipídica y con geometría icosaédrica, que se ha calculado miden aproximadamente 76 nm de diámetro. El genoma viral está compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena, cuyo tamaño varía entre 0.6 y 3.3 kilopares de bases (kb), que codifican para 6 proteínas estructurales (VP1 a VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1 a NSP6). El genoma viral se

encuentra envuelto por tres capas concéntricas de proteínas que forman una capa interna, una capa intermedia y una externa (Estes y Cohen, 1989) (Figura 1).

Proteínas estructurales

La capa más interna del virus está constituida por 60 dímeros de la proteína VP2 (102 kDa), que a su vez interacciona con las proteínas VP1 y VP3 (125 kDa y 88 kDa) a las cuales se les ha conferido la función de ser la polimerasa y la guanilil-transferasa del virión respectivamente. En conjunto las tres proteínas forman el “core” del virión que rodea al genoma viral. La capa intermedia está formada por 260 trímeros de la proteína VP6 (45 kDa), siendo ésta la proteína más abundante del virión ya que constituye el 40% de la proteína viral aproximadamente. La capa de VP6 en conjunto con el “core” constituyen la partícula transcripcionalmente activa en la replicación. La capa más externa se encuentra constituida por 260 trímeros de la proteína VP7 (37 kDa), lo que forma la superficie lisa del virión, y entre los cuales sobresalen 60 espículas formadas por dímeros de la proteína VP4 (88 kDa), a la cual se le han atribuido funciones diversas como la especificidad de huésped, la unión del virus a sus receptores celulares así como la entrada del virus a las células (Estes y Cohen, 1989) (Figura 1).

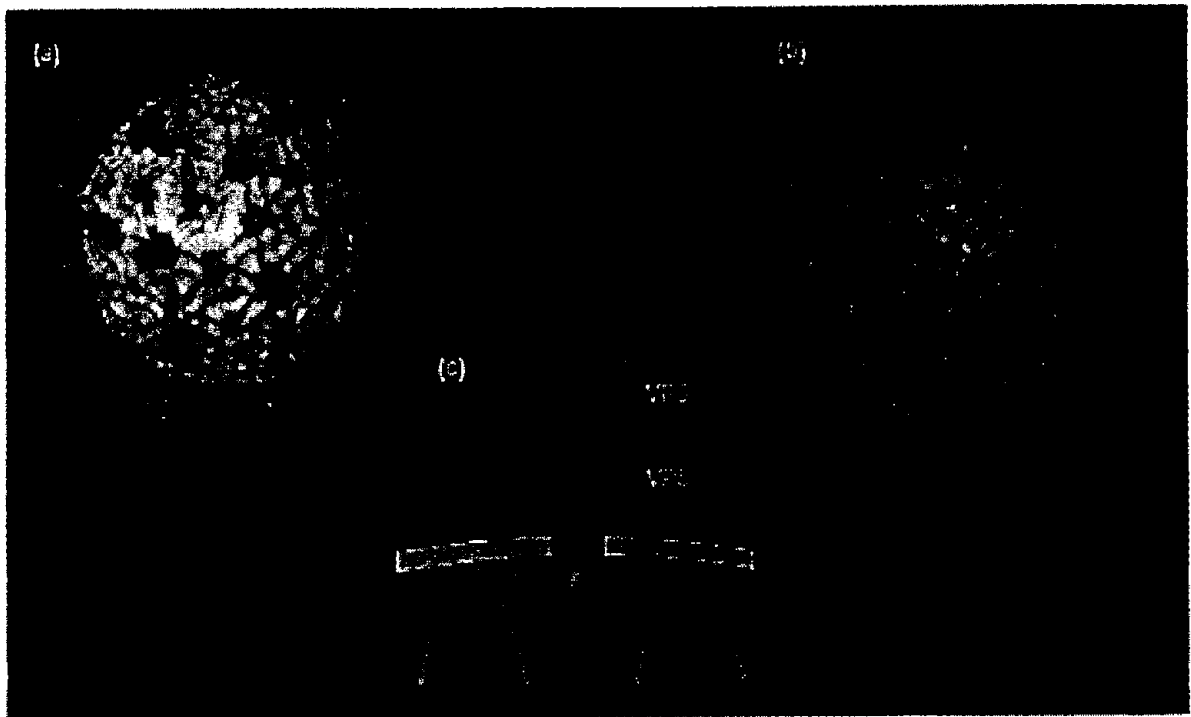


Figura 1. La partícula del rotavirus. a) La partícula viral con sus tres capas ó TLP, formada por las proteínas constituyentes de la molécula de dos capas ó DLP y por las proteínas VP4 mostrada en rojo y la proteína VP7 en amarillo. b) La partícula de dos capas ó DLP, formada por las proteínas del “core” viral integrado por la proteína VP2 y en menor medida por las proteínas VP1 y VP3, así como de la proteína VP6 mostrada en azul en la que se encuentran ancladas las espículas formadas por la proteína VP4. c) Imagen de un dímero de VP4 con sus dominios VP5 y VP8, la proteína VP4 formará las espículas que sobresalen de entre la proteína VP7 en color amarillo. (Tomado de Arias & López 2004).

Estudios anteriores han determinado que la proteína VP4, al ser tratada con tripsina, se corta generando dos polipéptidos a los cuáles se les ha denominado VP8 (28 kDa) que abarca el extremo amino terminal de la proteína VP4, y VP5 (60 kDa) que esta constituida por el extremo carboxilo terminal de la proteína VP4 (Arias et al., 1996) (Figura 2). Dicho corte es esencial para la infectividad del virus, sin embargo no afecta la unión del virus a la célula (Arias et al., 2002). Estas observaciones han llevado a suponer que el proceso de

corte de VP4 es esencial para un paso posterior a la unión del virus como podría ser la penetración a la célula.

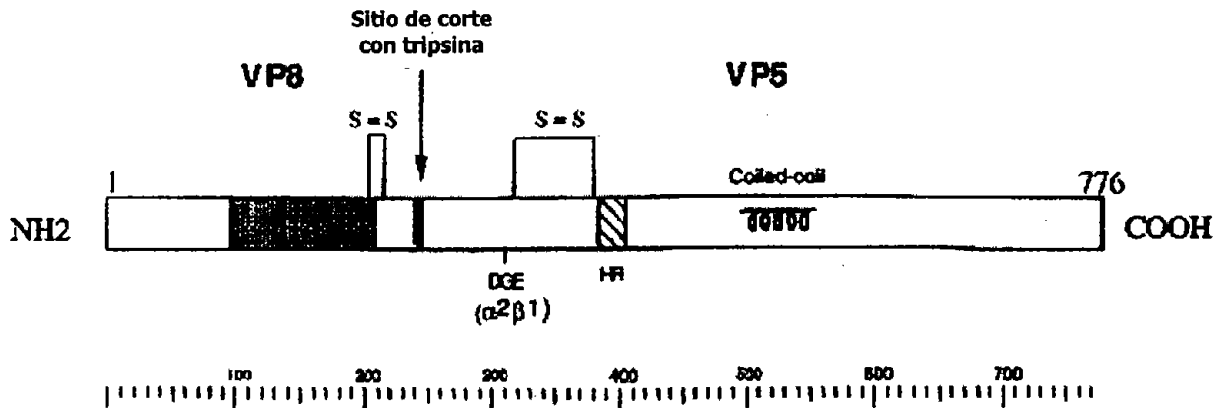


Figura 2. Esquema de la proteína VP4. Se muestra el sitio de corte con tripsina que divide la proteína en sus dos principales dominios VP5 y VP8. El dominio de hemaglutinación importante para la unión del virus con el ácido siálico de la membrana celular en VP8 se muestra sombreado, mientras que la secuencia DGE importante para la unión del virus a la integrina $\alpha 2 \beta 1$, así como la región hidrófoba "coiled-coil" presuntamente implicada como dominio de fusión con la membrana plasmática también se indican (Modificado de Arias et al., 2002).

Interacción virus-célula

Si bien quedan aún muchas dudas en cuanto al ciclo de infección del virus, las nuevas herramientas desarrolladas en la biología molecular han permitido caracterizar algunos aspectos, como: la morfogénesis del virus que comienza con la transcripción y traducción del RNA viral en el citoplasma celular, la replicación y ensamblaje del virus dentro de los viroplasmias y del retículo endoplásmico y la liberación de nuevas partículas virales. Hasta el momento, los eventos iniciales en la interacción virus-célula como la unión del virus a las células y penetración del virus se desconocen (Figura 3).

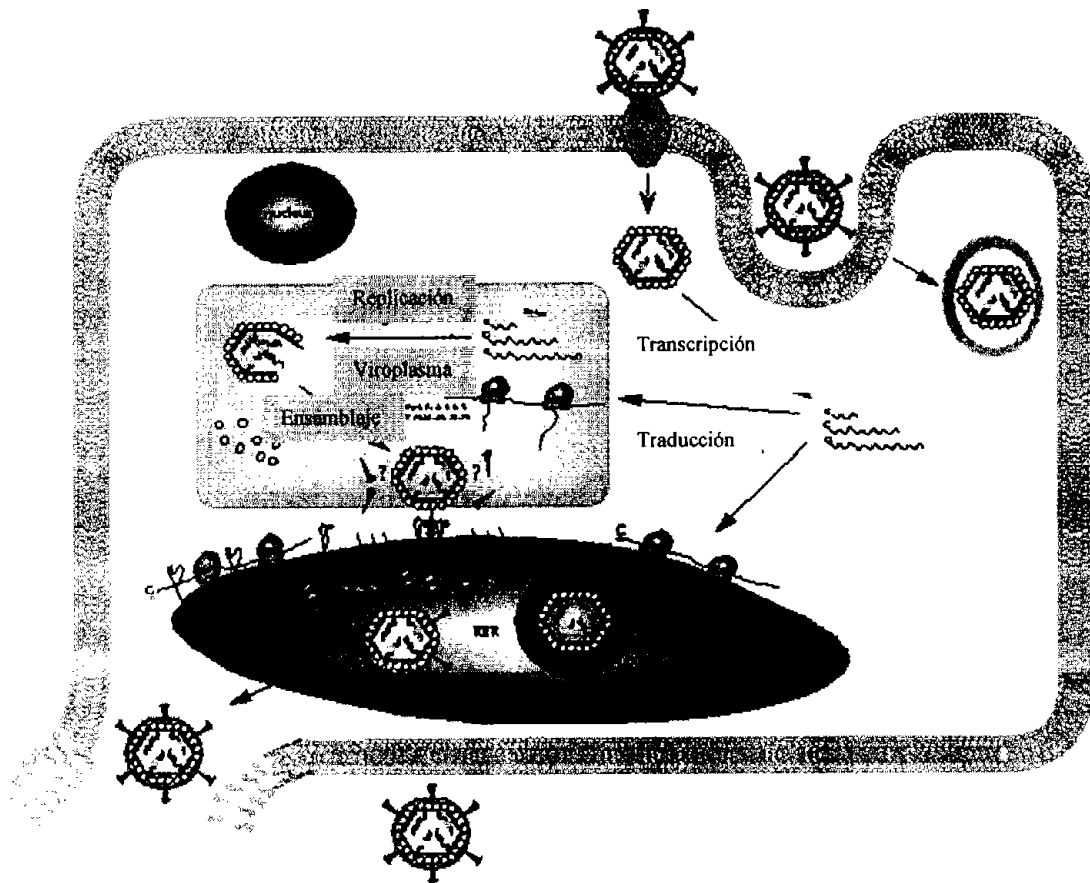


Figura 3. El ciclo de infección de los rotavirus.

Unión de los rotavirus a las células

In vivo se ha determinado que los rotavirus poseen un tropismo muy específico ya que solamente son capaces de infectar los enterocitos diferenciados de las vellosidades del intestino delgado. Las primeras interacciones que se dan entre una partícula viral y su célula blanco involucran el reconocimiento y unión del virus con el o los receptores presentes en la superficie celular. Una vez que el virus se encuentra ante las células a las

que es capaz de infectar se da el proceso de unión del virus a la célula o “adsorción”. Durante el proceso de adsorción el virus se une a receptores en la superficie celular a través de la proteína VP4. Entre los receptores que se han propuesto como importantes para la interacción se encuentran el ácido siálico, algunas integrinas, así como la proteína de choque térmico hsc70 (Arias et al., 2001 ; Arias et al.,2002).

Ácido siálico.- Para algunas cepas de rotavirus como RRV (*Rhesus rotavirus*; rotavirus de simio) se sabe que se requiere de la presencia de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) en la superficie celular para que se de la unión del virus a las células. Dicha unión es mediada por el dominio de hemaglutinación que comprende los aminoácidos 93 al 208 de la subunidad VP8, siendo los residuos de tirosina 155 y 188, así como la serina 190, los directamente implicados en esta interacción (Isa et al., 1997). Una de las características que exhiben estas cepas es que, al tratar las células con neuraminidasa, la infectividad de los virus se ve disminuida en gran medida.

Integrinas.- Ciarlet y Estes en 1999, reportaron que una de las características que comparten muchas de las cepas de rotavirus aisladas de humano es su insensibilidad a tratamientos con neuroaminidasa; además, se observó que la unión al ácido siálico no es esencial para la cepa de RRV (rotavirus de animales), ya que se aisló una mutante denominada nar3 que no requiere de la presencia de ácido siálico para su unión a la superficie celular (Méndez et al.,1996). Esto llevo a la búsqueda de nuevos receptores presentes en la superficie celular por métodos bioquímicos y moleculares, identificando las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$ y $\alpha v\beta 3$. A la integrina $\alpha 2\beta 1$ se une VP5 a través de la secuencia

peptídica DGE (Aspártico-Glicina-Glutámico) que comprende los aminoácidos 307 a 309 de la proteína, siendo esta misma integrina la utilizada por la variante del virus RRV denominada nar3 en su proceso de infección (Zárate et al., 2000). VP7 se une a las integrinas $\alpha\beta 2$ por medio de la secuencia peptídica GPR (Glicina-prolina-Arginina) localizados en los aminoácidos 253 a 255 de la proteína viral (Coulson et al., 1997) y a las integrinas $\alpha\beta 3$ por medio de una región denominada CNP que comprende los aminoácidos 161 a 169 de la proteína viral (Zárate S., 2002).

Finalmente en estos mismos estudios se menciona que anticuerpos neutralizantes de la proteína VP7 bloquean la infectividad de los rotavirus pero no su unión a la célula, lo mismo ocurre cuando las células se incuban con los péptidos sintéticos GRP y CNP antes de la infección con rotavirus. Estos resultados sugieren que la unión de los rotavirus a través de VP7 a las integrinas $\alpha\beta 2$ y $\alpha\beta 3$ sucede en un paso posterior a la unión del virus con la superficie celular.

Proteína Hsc70.- Otra de las moléculas a las cuáles también se le ha atribuido un papel importante como receptor celular para la infección por rotavirus es la proteína de choque térmico Hsc70. La unión de los rotavirus a la proteína Hsc70 está mediada por un dominio localizado entre los aminoácidos 642 y 659 de la proteína VP5. Al igual que como sucede con las integrinas, la utilización de anticuerpos neutralizantes contra VP5, así como un péptido que mimetiza al dominio de VP5 que se une a Hsc70 denominado *KID*, disminuye la infectividad del virus pero no así su unión a la superficie celular (Zárate et al., 2000).

Tomando en conjunto las evidencias anteriores, se ha propuesto un modelo que describe las interacciones iniciales del rotavirus con su célula blanco (Figura 4). En este modelo se propone que, para el caso de los virus RRV que requieren de la presencia de ácido siálico, el virus primeramente se une al ácido siálico a través de la proteína VP8. Posiblemente esa unión provoque un cambio conformacional en la proteína VP4 que permita que la proteína VP5, a través del péptido DGE, se una a la integrina $\alpha 2\beta 1$ como segundo paso en la unión del virus a la superficie celular; dicha unión es la que lleva a cabo la variante de RRV denominada nar3 como primer paso durante la infección. Esta segunda interacción a su vez puede estar facilitando las siguientes interacciones del virus con su célula blanco; de este modo, VP5 a través del dominio *KID* se une a la proteína Hsc70 y la proteína VP7 se une a las integrinas $\alpha x\beta 2$ y $\alpha v\beta 3$, por medio de los dominios GPR y CNP respectivamente, siendo estas últimas tres interacciones importantes para la entrada del virus al interior celular.

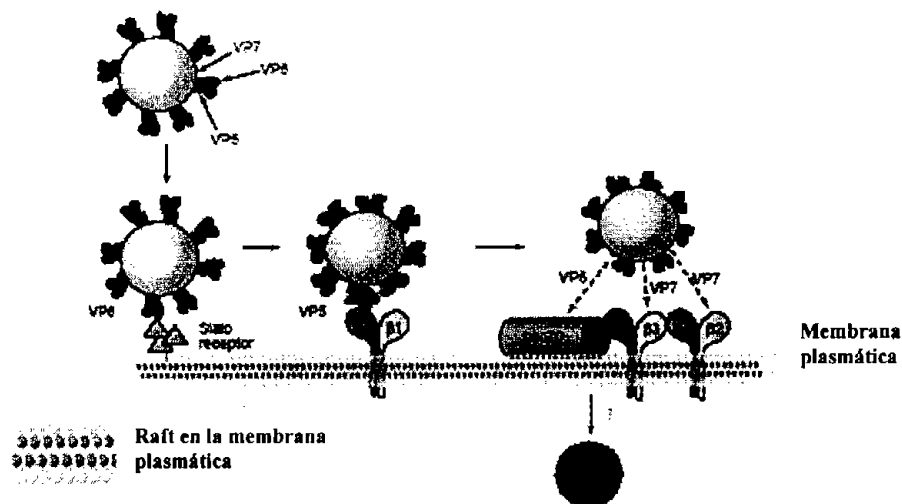


Figura 4. Modelo de unión del rotavirus a su célula blanco. Se muestran las interacciones iniciales de los rotavirus RRV con la célula blanco, así como las proteínas virales involucradas a la unión con los receptores celulares (Modificado de Arias & López., 2004).

Entrada de los rotavirus a las células

Posterior a la unión del virus a las células se da la penetración, el cuál es el mecanismo por el que el virus ingresa al interior celular. Aún no es claro como se lleva a cabo este evento.

En 1985 Susuki y colaboradores propusieron, con base en observaciones realizadas con microscopia electrónica, que la entrada de los rotavirus a las células podía llevarse a cabo por dos vías, por endocitosis o penetración directa. Sin embargo, también se encontró que las dos vías de entrada no eran igualmente efectivas para infección por rotavirus y que la penetración directa era la vía por la cual los rotavirus eran capaces de infectar a las células. En cambio, por endocitosis se internalizaban partículas virales hacia una vía no productiva para la infección (Susuki et al., 1985). Esta observaciones fueron apoyadas por experimentos de cinética de desaparición de las partículas virales de la superficie celular en las que se determinó que las partículas activadas por tratamiento con tripsina, y por lo tanto infecciosas, desaparecían de la superficie celular en los primeros 5 minutos provocando un efecto citopático en las células, mientras que el tiempo de desaparición de las partículas no activadas era de 40-45 minutos, siendo encontradas estas últimas dentro de vesículas parecidas a endosomas al ser observadas por microscopia electrónica (Kaljot et al., 1988).

Asimismo se observó que al inhibir la endocitosis con desacopladores energéticos de la endocitosis como la azida de sodio y el dinitrofenol, agentes lisosomotróficos como el cloruro de amonio y la clororquina, y algunos agentes que afectan al citoesqueleto como la colchicina, metilamina y monensina, no tenían efecto alguno en la infección por rotavirus

(Bass et al., 1995). Estas observaciones llevaron a suponer que una vía diferente a la endocitosis era la utilizada por los rotavirus para entrar a las células y llevar a cabo un ciclo infeccioso.

Adicionalmente, la penetración directa fue propuesta como el mecanismo de entrada de los virus, basado en experimentos en los que se observó que los rotavirus son capaces de permeabilizar la membrana de las células promoviendo la liberación de iones en células precargadas o bien al promover la entrada de toxinas normalmente no permeables a la membrana (Kaljot et al., 1988; Cuadras et. al., 1997). Se caracterizó a las proteínas virales VP4 (Tihova et al., 2001), así como la proteína VP7 (Charpilienne et al., 1997) como las directamente implicadas en la permeabilización.

Con base en la observación de que las proteínas virales VP4 y VP7 tienen la capacidad de inducir una permeabilización de las membranas celulares y que la Bafilomicina A (que tiene la capacidad de inhibir la bomba proton-ATPasa en el endosoma) bloquea la infección de los rotavirus, Chemello y su grupo propusieron un modelo de entrada de los rotavirus dependiente de calcio y mediada por clatrina. En este modelo se propone que los rotavirus son internados por una endocitosis mediada por clatrina y por la disminución en la concentración de calcio dentro de la vesícula debida a la entrada de iones H^+ y la concomitante salida de iones de Ca^{2+} promovida por la bomba proton-ATPasa endosomal, las capas externas de la partícula viral se solubilizan provocando que la membrana del endosoma se permeabilice, liberando hacia el citoplasma

la partícula viral en su forma de doble capa ó DLP activa para la transcripción (Chemello et al., 2002).

Recientemente se evaluó la vía de entrada de los rotavirus a las células con el uso de drogas que afectan diferentes vías de endocitosis y con proteínas celulares esenciales en las diferentes vías expresadas en forma de mutantes dominantes negativas (Sánchez San-Martín et al., 2004). Las dominantes negativas son proteínas que tienen mutaciones en sitios esenciales para llevar a cabo su función por lo que son inactivas generalmente. Para evaluar la endocitosis mediada por clatrina se utilizó una mutante de la proteína Eps 15 (componente del complejo adaptador AP-2 que permite que la clatrina sea reclutada hacia los sitios de endocitosis), clorpromazina, dansilcadaverina y cloruro de amonio; para la endocitosis mediada por caveolas se utilizó una mutante de la caveolina 1 (proteína importante en la formación de las vesículas de este tipo de endocitosis) (Cooner y Schmid, 2003) y las drogas nistatina ó filipina (que se asocian al colesterol presente en microdominios de membrana denominados rafts necesarios para la formación de caveolas). Células MA104 que expresaron estas proteínas mutantes mediante transfección *in vitro*, ó que fueron tratadas con las drogas no inhibieron la infección por rotavirus, esto indicó que el virus no utiliza ninguna de estas vías como medio de entrada a las células (Sánchez San-Martín et al., 2004).

Otra proteína, la dinamina, se ha implicado directamente en varias rutas de endocitosis (McNiven et al., 2000). El uso de una mutante de dinamina deficiente en el dominio de GTPasa, denominada K44A (Damke et al.,1995) disminuyó la infección considerablemente. De este modo se ha determinado que la entrada de los rotavirus se lleva

a cabo por una vía que es independiente de clatrina o caveolina pero que depende de una dinamina funcional en las células (Sánchez San-Martín et al., 2004).

Papel de la dinamina en la endocitosis.

Como se mencionó, entre las proteínas celulares que pudieran estar implicadas directamente en la entrada de los rotavirus a las células se encuentra la dinamina. La dinamina pertenece a una familia de GTPasas, y se han encontrado tres diferentes variantes. La dinamina I se encuentra fundamentalmente en las neuronas, la dinamina II se expresa en todos los tejidos, mientras que la dinamina III se expresa fundamentalmente en testículos, pulmones y cerebro (Urrutia et al., 1997). Las tres proteínas tienen cuatro dominios altamente conservados entre ellas: un dominio de GTPasa, un dominio homólogo a pleckstrina (PH), un dominio “coiled-coil” (CC) y un dominio rico en prolinas (PRD) (Figura 5).

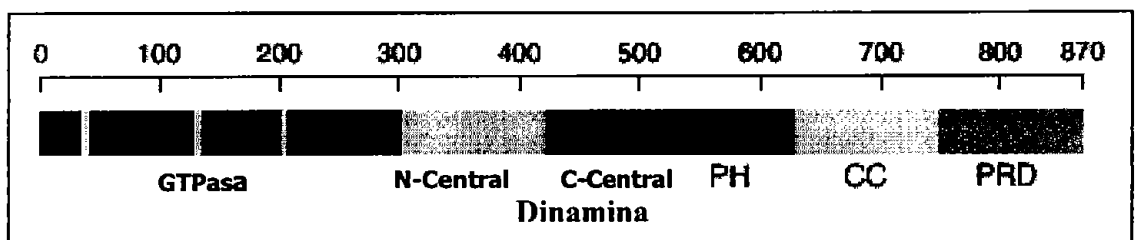


Figura 5. Representación esquemática de la Dinamina. Se muestran los dominios presentes en las diferentes dinaminas. Un dominio GTPasa en el extremo amino terminal, los dominios amino (N-) y carboxilo (C-) centrales altamente conservados de función desconocida, el dominio homólogo a pleckstrina (PH) el cual se cree media la interacción de la proteína con la membrana, una región “coiled-coil” (CC) la cuál ha sido implicada en la activación del dominio de GTPasa y un dominio rico en prolinas (PRD), el cuál media la interacción con proteínas del citoesqueleto y con otras proteínas con dominios SH3 (Modificado de McNiven et al., 2000).

Originalmente a la dinamina se le había asociado como exclusiva de la endocitosis mediada por receptor, también conocida como mediada por clatrina (Urrutia et al., 1997) pero se ha demostrado que participa también activamente en otras vías de endocitosis, ya sea por caveolina (Henley et al., 1998) o bien, por vías independientes a la clatrina y la caveolina, así como en la escisión de vesículas de transporte intracelular e incluso procesos de morfogénesis de organelos permitiendo el transporte de proteínas hacia la mitocondria, retículo endoplasmico y golgi, (McNiven et al., 2000; Lamaze et al., 2001; Cooner y Schmidt, 2003) (figura 6).

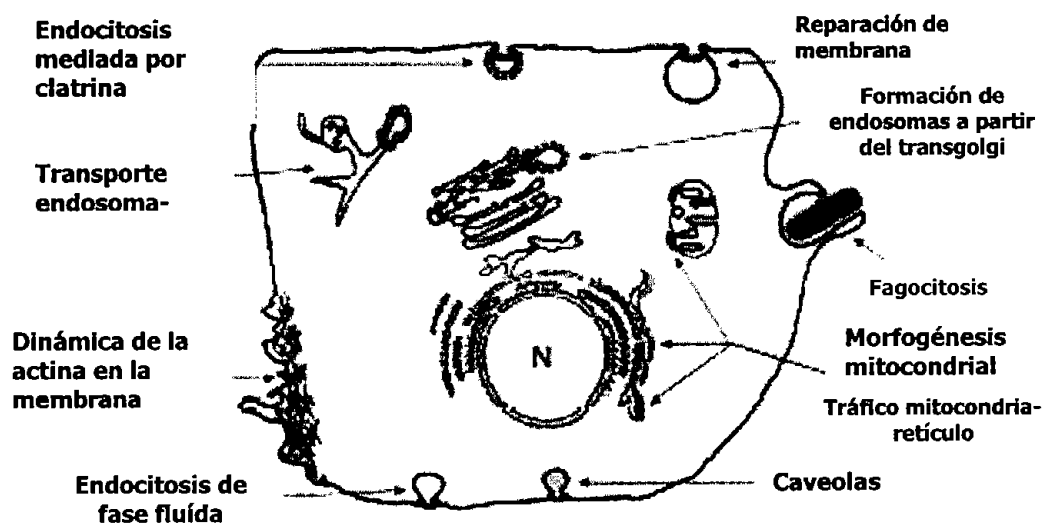


Figura 6. Vías en las que se encuentra implicada la Dinamina. Se muestran los diferentes procesos o eventos celulares en los que la dinamina participa (Modificado de McNiven et al., 2000.).

Debido a la participación de la dinamina en las vías de endocitosis, su importancia también se ha demostrado en la entrada de algunos virus a sus células blanco. La expresión de una mutante de dinamina denominada K44A, deficiente en su dominio de GTPasa (Damke et al., 1995), inhibe la entrada de virus como SFV (Semliki Forest Virus), Sindbis virus, rhinovirus, parvovirus, influenza virus, adenovirus y avian leukosis virus (Revisado en Siczekarski y Whittaker, 2002).

El papel de la dinamina en la endocitosis hasta la fecha no ha sido determinado con exactitud. Se propone que la dinamina puede estar funcionando ya sea como una mecanoenzima o bien una GTPasa reguladora. La función de mecanoenzima se ha propuesto por su participación en los procesos de liberación de las vesículas endocíticas de la membrana celular por medio de la hidrólisis de GTP (McNiven et al., 2000; Sever et al., 2000; Wiejak y Wyroba., 2002). La función de GTPasa reguladora se ha propuesto con base en observaciones de que proteínas mutantes defectivas en su ensamblaje no inhiben, sino que estimulan la endocitosis. En el modelo propuesto, el autoensamblaje de varias moléculas de dinamina provoca la activación del dominio GAP dentro de la misma molécula por autoregulación, la activación de este dominio a su vez es responsable del cese en la actividad endocítica y por lo tanto el provocar su desensamblaje y reciclaje. En estas proteínas mutantes defectuosas en su ensamblaje, no se interrumpe la actividad de la dinamina y en cambio, aumenta la actividad de endocitosis (Sever et al., 2000; Wiejak y Wyroba, 2002).

Otros estudios proponen una actividad reguladora para la dinamina basados en observaciones de que mutantes de esta proteína provocan cambios en la morfología celular, provocando la formación de podosomas (estructuras implicadas en la adhesión y motilidad celular) y la pérdida de la morfología celular clásica, al afectar proteínas implicadas en la dinámica del citoesqueleto como la actina (McNiven M. & Kim L., et al., 2000; Ochoa et al., 2000; Orth J. et al., 2002; Lee E. & De Camilli P., 2002; McNiven et al., 2004).

Interacciones de la Dinamina con el citoesqueleto

La dinamina al ser estimulada puede desencadenar cascadas de señalización intracelular por ser una proteína perteneciente a la familia de GTPasas, además de ejercer su función en la escisión de vesículas endocíticas (Cooner y Schmid, 2003). En consecuencia esto puede promover cambios en otras proteínas, entre ellas las del citoesqueleto.

Debido a que en su estructura la dinamina posee un dominio rico en prolina (PRD) se ha demostrado que es capaz de interactuar con otras proteínas en el interior celular que poseen un dominio denominado SH3 en su estructura. Estas proteínas tienen que ver con la remodelación del citoesqueleto celular, como son las proteínas cortactina, las sindapinas, el complejo Abp1 y el complejo WASP (figura 7).

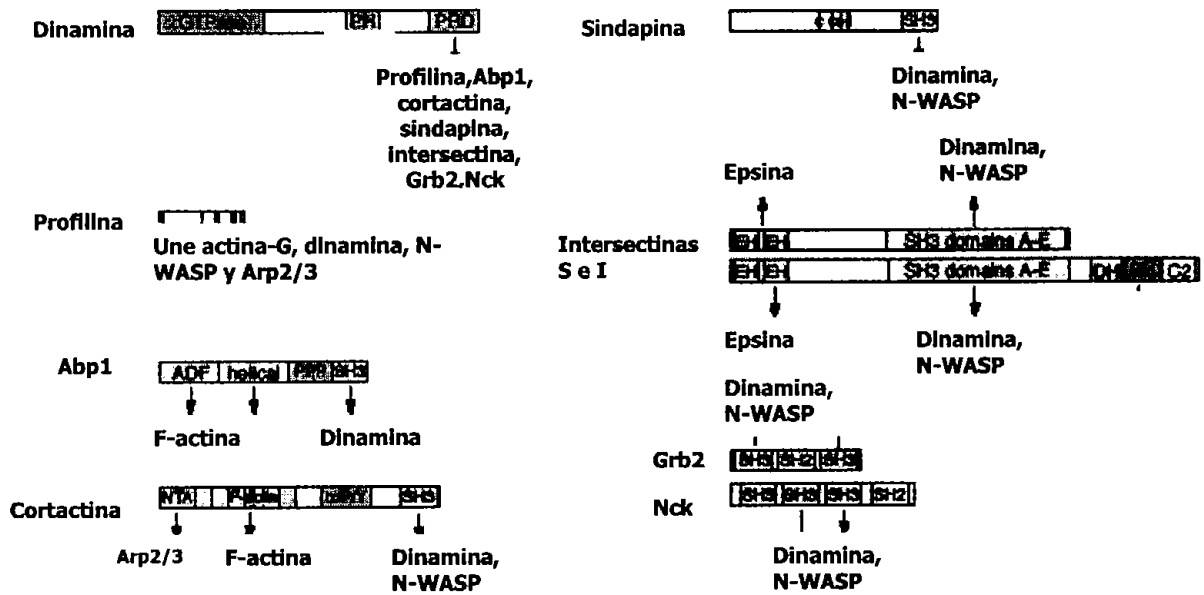


Figura 7. Proteínas que interaccionan con la dinamina. Se muestran las proteínas intracelulares descritas hasta el momento que pueden asociarse al dominio PRD de la dinamina por medio de su dominio SH3 (Modificado de Orth & McNiven. 2003).

La cortactina, la Abp1 y la familia de proteínas WASP se han caracterizado como las principales mediadoras de la interacción entre la dinamina y el citoesqueleto, siendo la interacción de una manera directa entre la dinamina y las primeras dos proteínas, mientras que la interacción entre la dinamina y WASP estará mediada a través de la sindapina. Una vez que la dinamina se encuentra en el sitio de endocitosis a través de su dominio PRD es capaz de asociarse con los dominios SH3 de la cortactina, la Abp1 y la sindapina, siendo estas proteínas las responsables de la activación del complejo de nucleación de actina Arp2/3. La cortactina y la Abp1 se asocian a la actina filamentosa directamente, la primera a través de una serie de seis repeticiones alineadas de 37 aminoácidos, mientras que la segunda se asocia a través de un dominio ADF (factor homólogo actina depolimerizante).

La sindapina se asocia a la familia de proteínas WASP que unen actina globular por medio de un dominio WH2 (dominio homólogo a WASP). Las tres proteínas son capaces de asociarse con el complejo Arp2/3 a través de una región acídica por lo que la nucleación de actina puede iniciarse (Qualmann et al., 2000; Lanzetti et al., 2001; Jeng y Welch., 2001).

Las proteínas con las cuales interacciona la dinamina son capaces de unir y remodelar la actina celular, capacidad que permite a estas proteínas promover la polimerización de los filamentos de actina para transporte intracelular y extracelular de diferentes productos (Qualmann y Mellor, 2003). La interacción de la dinamina con estas moléculas permite o promueve rearrreglos en los filamentos de actina necesarios para que la vesícula endocítica pueda ser separada de la membrana y transportada hacia el interior celular (Kessels et al., 2001; Kessels y Qualmann, 2002; Schafer D., 2002). En el modelo propuesto, una vez que la dinamina es reclutada hacia el sitio de endocitosis, interacciona con la membrana a través de su dominio homólogo a pleckstrina (PH), lo cual permite que por medio de la región “coiled-coil” (CC), el dominio de GTPasa sea activado autorregulando el ensamblaje o desensamblaje de la molécula. Mientras que el dominio rico en prolinas (PRD) permite la interacción con la maquinaria de citoesqueleto celular, favoreciendo con esto el proceso de escisión de la vesícula (Orth & McNiven. 2003). (Figura 8).

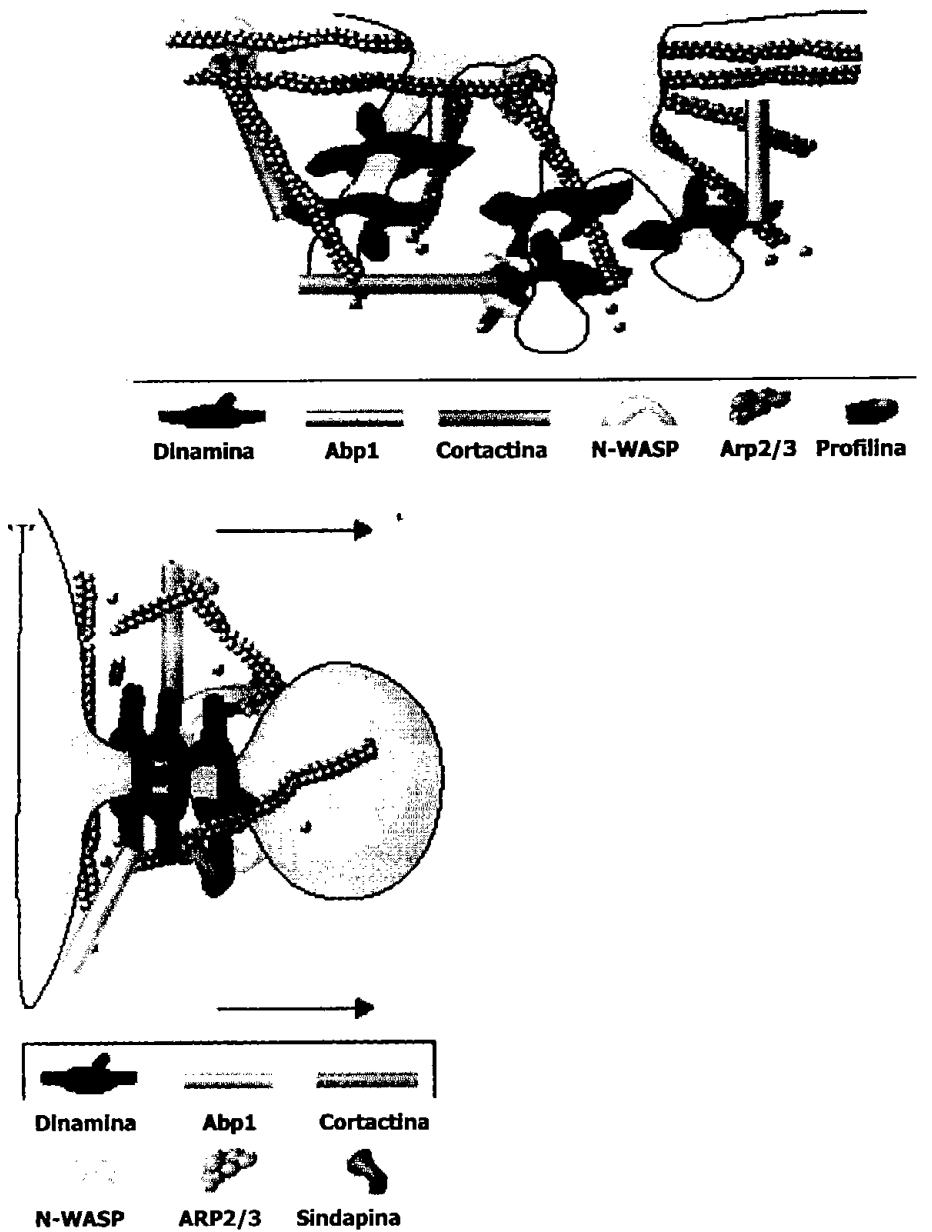


Figura 8. Esquemas representativos de las interacciones entre la dinamina y proteínas citoplásmicas necesarias para el proceso de endocitosis. (Modificado de Orth & McNiven. 2003.).

Lo anterior indica que, aunada a la función que posee la dinamina en la endocitosis, también se necesitan rearrreglos en el citoesqueleto para que la vesícula endocítica pueda ser desprendida de la membrana celular (Kessels et al., 2000; Krueger et al., 2003). El modelo propuesto para la acción del citoesqueleto en este proceso implica primeramente una organización espacial de la maquinaria endocítica, en la que participa la actina al transportar los componentes hacia el sitio de endocitosis; posteriormente, hay una deformación e invaginación de la membrana plasmática permitida por la disolución de la barrera de actina cortical, una vez formada la vesícula endocítica la actina permitirá la generación de una fuerza durante y después de la reacción de fisión que permitirá la movilización de la vesícula hacia el interior celular, mientras que en la membrana la actina promueve la reorganización de las moléculas endocíticas hacia posibles sitios susceptibles de endocitosis (Figura 9).

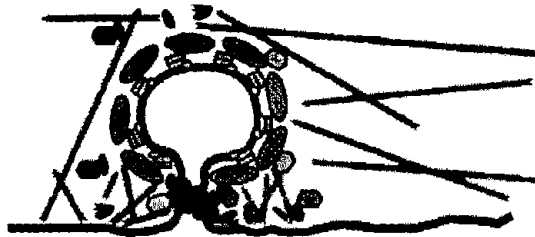
Organización espacial de la maquinaria endocítica



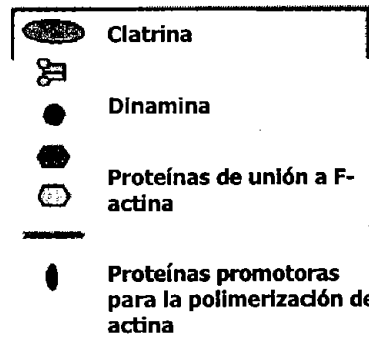
Deformación e invaginación de la membrana plasmática

Disolución de la barrera de actina cortical

Generación de fuerza durante y después de la reacción de fisión

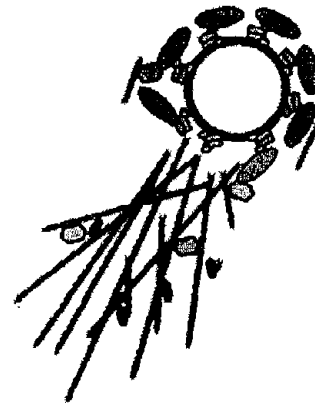


Movillización de la vesícula hacia el citoplasma



Proteínas de unión a dinamina

Filamentos de actina



La organización espacial de las moléculas tal vez promueve sitios susceptibles de endocitosis



Figura 9. Representación esquemática de las interacciones entre la dinamina y varias proteínas asociadas al citoesqueleto. (Modificado de Qualmann et al., 2000).

Estudio de la dinámica del citoesqueleto celular

Gran parte de los conocimientos obtenidos hasta el momento con respecto a los lazos funcionales entre la organización del citoesqueleto de actina, la endocitosis y la entrada de algunos virus en las células se ha logrado gracias a la utilización de drogas que afectan el citoesqueleto de actina al perturbar el intercambio entre los monómeros de actina en los filamentos. La actina, una de las proteínas citosólicas más abundantes en la célula, normalmente se encuentra en el entorno celular en forma globular monomérica (actina G). Una de las propiedades más representativas de la actina G es su capacidad de polimerizarse con otras moléculas de actina globular mediante hidrólisis de ATP para formar filamentos de actina (actina F) (Figura 10). Dicho proceso se ha caracterizado por ser muy activo, sin embargo, se ha observado que el largo de los filamentos de actina en estado normal en la célula, es mantenido debido a que las velocidades de polimerización en el extremo “barbado” y depolimerización en el extremo “puntiagudo” de los filamentos son iguales. La formación y ruptura activa de filamentos de actina es necesario para que se lleven a cabo eventos de endocitosis y transporte intracelular de vesículas en la célula (Lanzetti et al., 2001).

Entre las drogas que se han utilizado con el propósito de entender la dinámica de la actina y las funciones en las que se encuentra implicada, la citocalasina D ha sido de las mayormente utilizadas. La citocalasina D es una toxina de origen fúngico capaz de penetrar las membranas celulares, evita la formación de nuevos filamentos de actina y disgrega los ya existentes afectando la morfología celular. El mecanismo por el cual la toxina actúa se

basa en su capacidad de afectar la dinámica de polimerización y depolimerización en los filamentos de actina. Las moléculas de citocalasina D se unen a los extremos “barbados” de los filamentos evitando que nuevos monómeros de actina globular sean agregados y por lo tanto que la polimerización continúe a su velocidad normal, mientras que la actina filamentosa presente en el extremo “puntiagudo” continua disociándose sin afectarse por tanto la depolimerización (Figura 10) (Cooper J., 1987; Lanzetti et al., 2001).

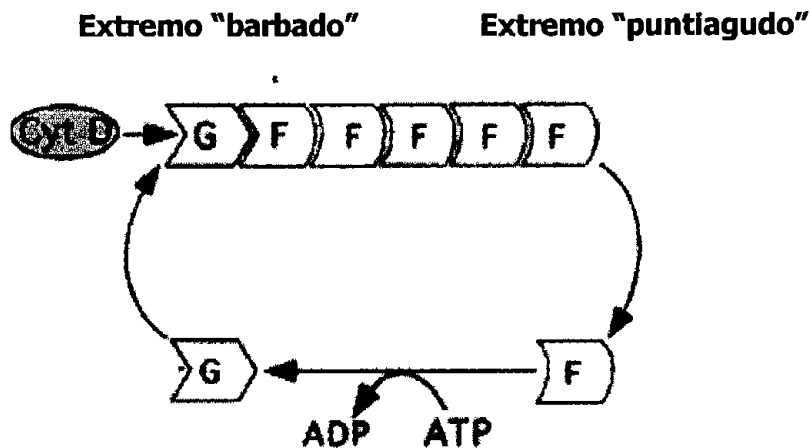


Figura 10. Dinámica de formación de los filamentos de actina y el efecto de la citocalasina D. Se muestra la dinámica de polimerización y depolimerización de los filamentos de actina así como el efecto de la citocalasina D sobre este proceso (Modificado de Lanzetti et al., 2001).

Una técnica utilizada para analizar los patrones del citoesqueleto y sus cambios es la inmunofluorescencia. En esta técnica se utilizan anticuerpos capaces de reconocer específicamente proteínas celulares o complejos de estas. Posteriormente con el uso de un anticuerpo secundario, acoplado a alguna molécula fluorescente, capaz de reconocer específicamente al primer anticuerpo, se puede identificar la localización de la molécula de

interés al analizar la preparación en un microscopio de fluorescencia. También es posible observar modificaciones en los patrones de localización de dichas moléculas.

Relación del citoesqueleto celular con la infección por Rotavirus

Debido al requerimiento que tienen los rotavirus de una dinamina activa en la célula para que se de su entrada y los reportes sobre las interacciones que la dinamina tiene con proteínas del citoesqueleto celular, resulta interesante observar si alguna de las proteínas del citoesqueleto cambia su distribución durante la entrada del virus en la célula.

Los estudios realizados hasta el momento sobre el papel de la actina en la entrada de los rotavirus a las células resultan contradictorios ya que, al tratar células MA104 con diferentes concentraciones de la droga citocalasina D (1, 10 y 20 μ M) e infectarlas con RRV, después de 14 horas no se afecta la infección (Cuadras et. al. 1997). Estos resultados sugirieron que la actina celular no tenía ningún efecto para la infección del virus, y por lo tanto tampoco parecía ejercer papel alguno en la entrada del virus. En contraste, en el trabajo realizado por el grupo de Dorsey Bass y colaboradores (1995) el tratamiento con citocalacina D de células murinas L, normalmente no permisivas a la infección por rotavirus, incrementó la infección en 5 ó 10 veces la infección control. En este trabajo se propone que la depolimerización de la actina filamentosa en las células evita que los virus sean atrapados dentro de vesículas que impiden al virus iniciar un ciclo infeccioso. Por lo que entonces a la actina se le atribuyó un papel inhibitorio en este tipo celular. Reportes

previos mencionan que los efectos provocados por rotavirus sobre el citoesqueleto de diferentes líneas celulares son variables. En células Caco-2 (células de cáncer de colon humano) y en células epiteliales intestinales rotavirus produce cambios en los filamentos de actina de las microvelocidades (Jourdan et al., 1998; Brunet et al., 2000), mientras que en células CV-1 (células de riñon de mono verde africano) no se observa efecto alguno sobre el citoesqueleto de actina, ni sobre los microtubulos, sin embargo sí hay un efecto sobre el patrón de la vimentina (Weclowitz et al., 1994). Un aspecto importante en estos trabajos es que el análisis se realiza cuando la infección puede ser visible en las células lo que implica un estado avanzado de ésta y no en tiempos cortos cuándo la entrada del virus esta sucediendo, por lo que no es claro si el efecto observado también puede darse en las fases iniciales de la infección, como sería durante la entrada del virus.

Por la importancia de la dinamina en la entrada del virus, así como las conexiones que actualmente se están encontrando entre esta proteína y el citoesqueleto, resulta de interés analizar el papel del citoesqueleto en tiempos cortos de la infección.

En el presente trabajo se realizaron experimentos con el propósito de observar si la infección del rotavirus RRV (*Rhesus rotavirus*) podría modificar los patrones de actina en células MA104 (células de riñon de mono) en el momento de la entrada del virus.

Hipótesis

Considerando que la dinamina interacciona con las proteínas Abp1, cortactina y profilina que a su vez interaccionan con actina, y que la entrada de rotavirus requiere de una dinamina activa en la célula, si el papel de la dinamina durante la entrada de los rotavirus a las células está relacionado con el citoesqueleto de actina, entonces los rotavirus podrían necesitar o generar cambios en éste durante su proceso de entrada.

Objetivos

General

Determinar el efecto que tiene la infección por rotavirus sobre la distribución de la actina en las células MA104 en cultivo mediante inmunofluorescencia.

Particulares

1.- Observar la distribución de la actina en las células MA104 por inmunofluorescencia.

2.- Observar la distribución de la actina en células MA104 infectadas por rotavirus a diferentes tiempos.

3.- Observar la distribución de la actina en células tratadas con citocalacina D e infectadas con rotavirus a diferentes tiempos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus

La cepa de rotavirus utilizada corresponde a un rotavirus de simios denominado RRV (*Rhesus rotavirus*) adaptado a crecer en cultivo celular.

Cultivo Celular

La línea celular MA104 procedente de epitelio de riñón de mono se cultivó a confluencia en frascos de cultivo de 75 mm de área ó en portaobjetos de 10 mm en cajas de 24 pozos a 37°C, en un ambiente húmedo con 5% de CO₂, en medio mínimo esencial (MEM) (Gibco/BRL), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco).

Lisado viral

Para la obtención de lisados virales se cultivaron células MA104 en frascos de cultivo y se infectaron con el virus RRV a una multiplicidad de infección (moi) de 0.1 ffu por célula. Se incubó a 37°C hasta ver efecto citopático completo en las células, para después congelar a -65°C.

El lisado viral se congeló y descongeló tres veces y el virus se activó con tripsina (10 µg/ ml) por 30 minutos a 37°C.

Infección con RRV

Células MA104 fueron cultivadas a confluencia sobre portaobjetos en cajas de 24 pozos. Después de un lavado con medio MEM sin suero las células se colocaron en hielo por 10 minutos y se infectaron con virus RRV a una multiplicidad de infección de 5 virus por célula por 30 minutos a 4°C. Después de pasado este tiempo se lavaron las células con medio MEM sin suero para eliminar el virus que no se hubiera unido a las células e se incubó la caja a 37°C. Las muestras fueron procesadas a los 0, 15, 30, 45, 60 minutos o bien por 6 horas (tiempo necesario para poder identificar al virus al teñir a la proteína viral NSP5 producto de la replicación de este en el interior celular). El procesamiento consistió en retirar los portaobjetos con células de 37°C, se lavaron 1 vez con buffer de fosfatos salino pH 7.4 PBS (NaCl 0.8%, Na₂HPO₄ 0.115%, KH₂PO₄ 0.024%) y se prepararon para inmunofluorescencia.

Inmunofluorescencia

La fijación de las células para inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando metanol 100% previamente enfriado por 15 minutos a -20°C, después se lavaron las células 4 veces, 5 minutos cada una con PBS NH₄Cl 50mM (solución de lavado). La permeabilización de las células se realizó con 0.5% de Tritón X-100 (Sigma) en solución de

bloqueo (1% de BSA (Sigma), NH_4Cl 50 mM en PBS) por 15 minutos a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavaron una vez más con solución de lavado y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) diluidos en PBS NH_4Cl 50 mM. La actina celular filamentosa y globular fue detectada con un anticuerpo monoclonal α -actina que detecta ambas formas (clona AC-40, Sigma), mientras que la proteína viral NSP5 se detectó con un anticuerpo policlonal purificado de conejo denominado C6 α -NSP5. Después las células se lavaron de nuevo 4 veces por 5 minutos con solución de lavado y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en solución de lavado por 1 hora (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a temperatura ambiente. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anti-ratón acoplado al fluoróforo alexa 488 y anti-conejo acoplado al fluoróforo alexa 568 (*Molecular Probes*). Posteriormente las preparaciones se lavaron 4 veces por 5 minutos con solución de lavado y se montaron en glicerol al 70%.

Tratamiento con citocalasina D

Células MA104 fueron crecidas a confluencia en cajas de 24 pozos de la misma manera descrita anteriormente. Después se lavaron con 500 μl por pozo de medio MEM sin suero antes de agregar la droga citocalasina D de *Zygosporium monsanii* (Sigma) a las concentraciones deseadas 1 μM , 3 μM , 5 μM , 7 μM y 10 μM .

Se agregaron 250 μl ya sea de MEM sin suero para las células control o bien 250 μl de la mezcla de MEM sin suero y citocalasina D para los pozos con tratamiento. Se dejó la

mezcla con las células por los diferentes tiempos en incubación a 37°C, se infectaron o no con el rotavirus RRV según se indique y se procesaron para inmunofluorescencia.

Microscopia

Las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon eclipse E600 y las fotos fueron tomadas con una cámara digital Nikon DXM1200 adaptada al microscopio. El procesamiento de las fotografías se realizó con el programa Adobe Photoshop ver.7.0.

La microscopia confocal se realizó con el uso del sistema Bio-RadMRC-600 montado en un microscopio Axiovert (Zeiss).

Resultados

Detección de los patrones de actina en las células MA104 en cultivo por la técnica de inmunofluorescencia.

Con el objetivo de identificar los patrones de actina en las células MA104 se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con diferentes fluoróforos, pudiendo identificar los patrones de actina en las células con el uso de un anticuerpo monoclonal anti-actina y un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo alexa 488 (Figura 11).

El anticuerpo monoclonal antiactina utilizado es un anticuerpo comercial que reconoce un epítotope localizado en la región Carboxilo-terminal de la actina conservada en todas las isoformas de actina, por lo que la señal observada corresponde a la actina total en las células.

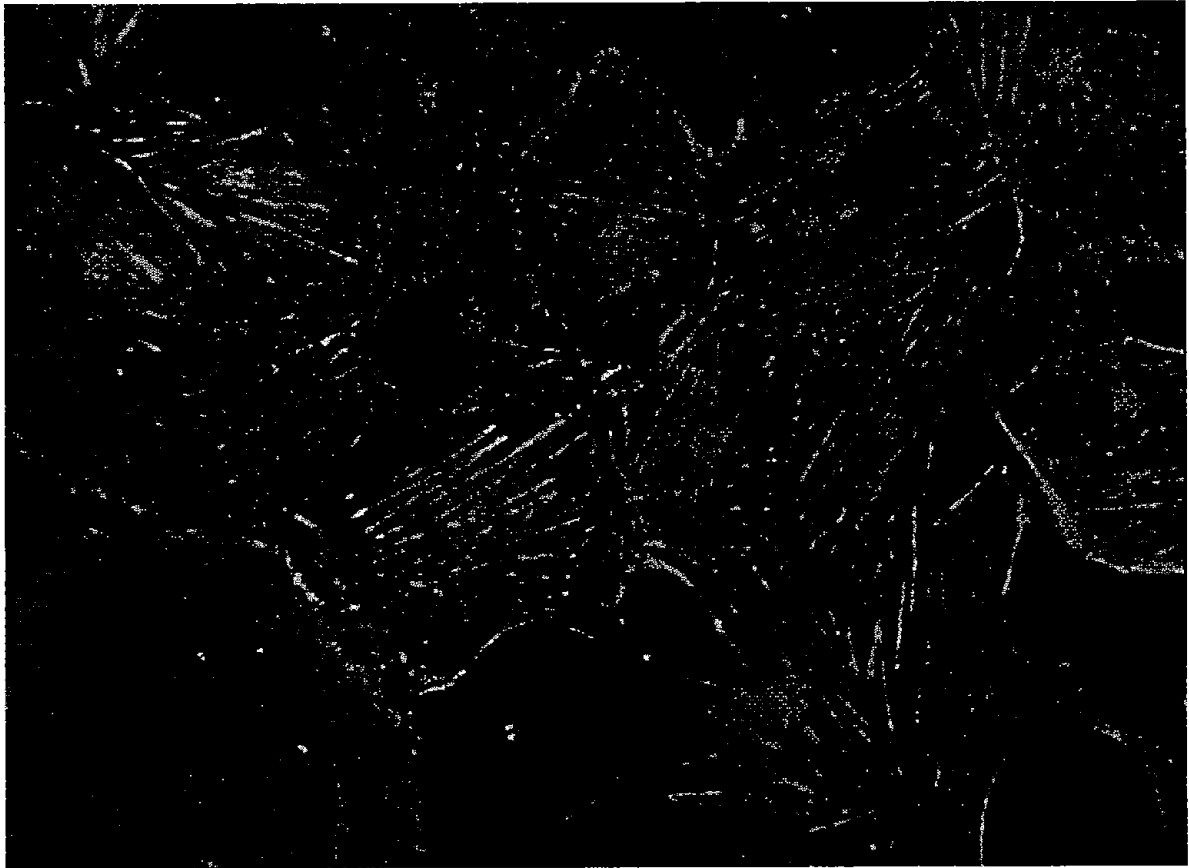


Figura 11. Patrones de actina en células MA104 en cultivo. Se identifico la actina con un anticuerpo monoclonal antiactina y con un anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo alexa 488.

Patrones de actina en células MA104 infectadas con el virus RRV a diferentes tiempos.

Con el objetivo de observar si la infección con rotavirus RRV tenía algún efecto sobre los patrones de actina de células MA104 en cultivo, se infectaron las células con el rotavirus RRV a una multiplicidad de infección de 5 virus por célula y se detectó la actina por inmunofluorescencia a los 0, 15, 30, 45, 60 minutos y a las 6 horas. Como control se utilizaron células que solo fueron incubadas con medio MEM sin suero (figuras 12 y 13).

En la figura 12 se muestra que la señal correspondiente a la actina a los 0, 15, 30 minutos, cambia su distribución en las células infectadas (b, d y f) con respecto al control no infectado (a, c y e) siendo además este cambio gradual conforme pasa el tiempo.

En la figura 13 se observa un cambio evidente en la distribución de la señal correspondiente a la actina en casi todas las células a los 45 y 60 minutos de infección (h y j), mientras que este cambio no se puede ver en las células no infectadas (g, i). Por otra parte, a las 6 horas (k), donde se detecta proteína viral NSP5 (l), con la multiplicidad de infección utilizada la totalidad de las células están infectadas; este control nos indica que todas las células estuvieron en contacto con el virus a los tiempos cortos probados y por lo tanto, los cambios en la distribución de la señal de actina se deben a la interacción del virus con las células en estadios tempranos de la infección.

Como control de especificidad de la señal detectada, no se detectó señal en células que fueron tratadas solamente con el anticuerpo secundario acoplado a los fluoróforos, lo cual es indicativo de que los cambios detectados son específicos para la infección.

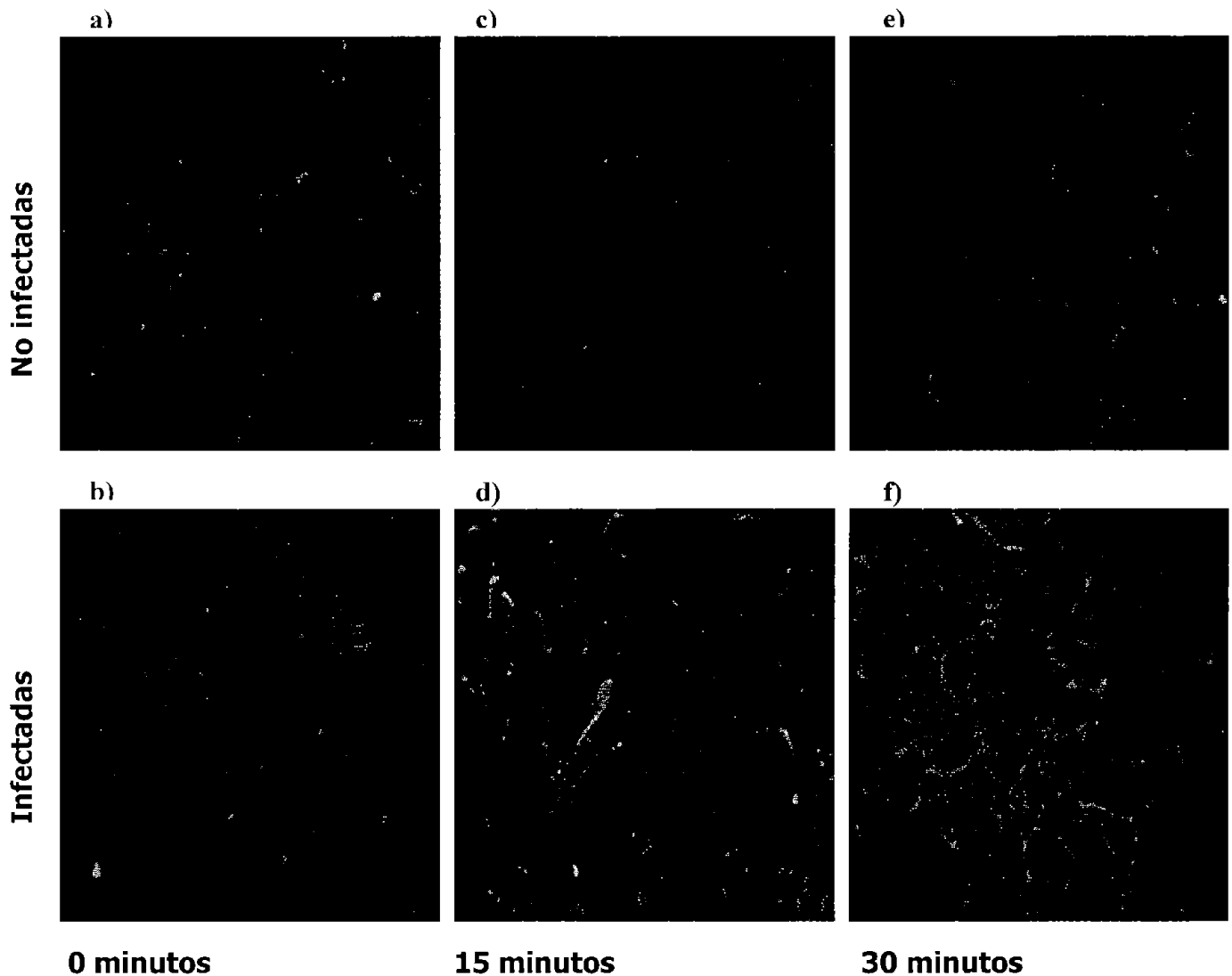


Figura 12. Efecto de la infección por rotavirus a los 0,15 y 30 minutos sobre la distribución de la actina en células MA104. Células MA104 se crecieron a confluencia, se incubaron con medio solo como control o con rotavirus RRV a una multiplicidad de infección de 5 ffu/ célula, el virus se dejó adsorber por 30 minutos y después se dejó proseguir la infección, sacando las muestras a diferentes tiempos y procesándolas para inmunofluorescencia. La actina de las células se detectó como se explica en la figura 11. Se muestra un campo representativo de por lo menos 5 analizados para cada preparación.

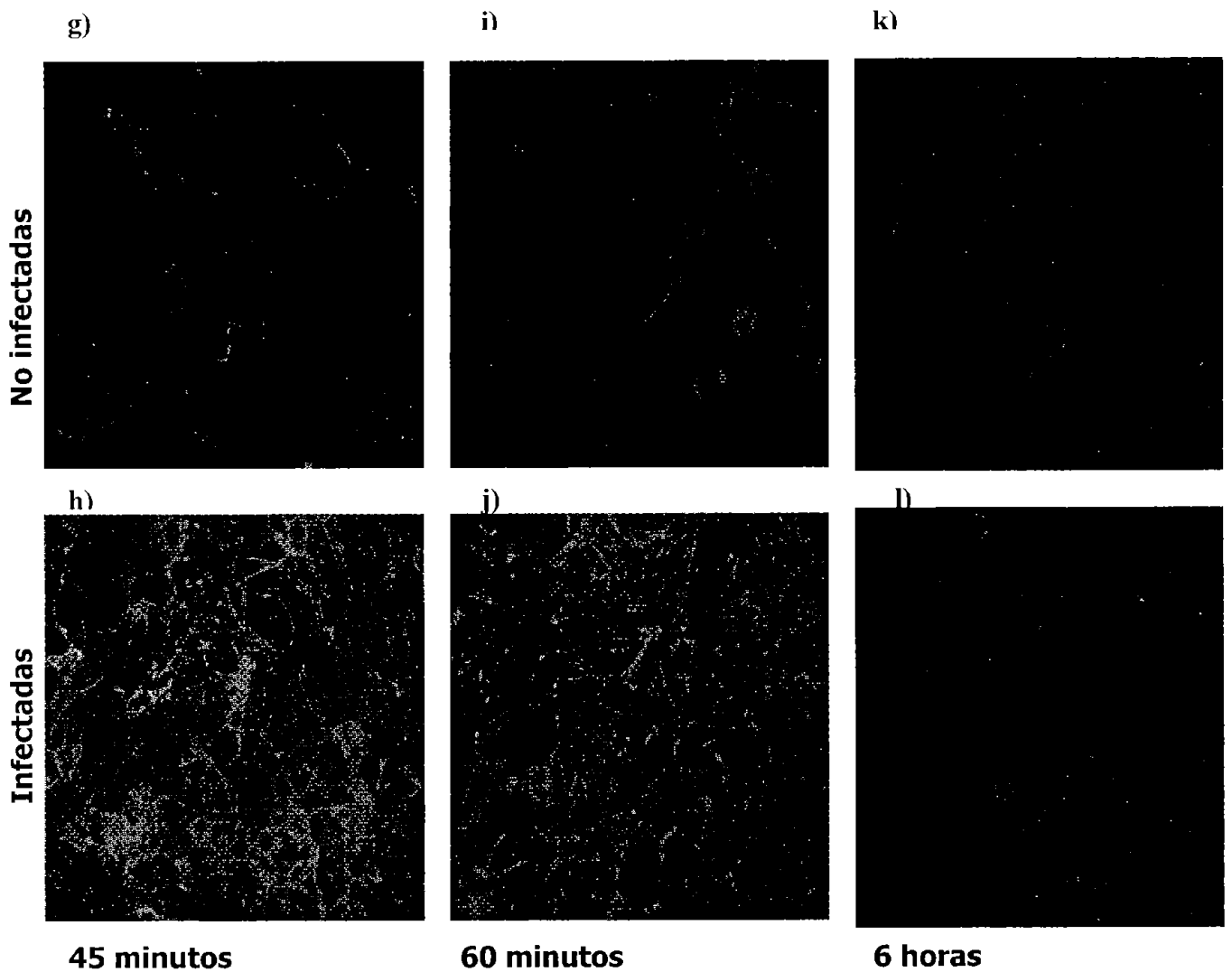


Figura 13. Efecto de la infección por rotavirus a los 45, 60 minutos y 6 horas sobre la distribución de la actina en células MA104. La proteína viral NSP5 se identificó con un anticuerpo policlonal α -NSP5 y un anticuepo secundario anti conejo-alexa 568. Se muestra un campo representativo de por lo menos 5 analizados para cada preparación.

Para corroborar el cambio en la distribución de la señal de actina en las células infectadas observadas por inmunofluorescencia, se trataron células como se describió anteriormente y se procesaron para microscopia confocal. El microscopio confocal se ha constituido como una de las herramientas más útiles en los estudios basados en microscopia actualmente ya que permite la observación de diferentes planos en la muestra creando así una imagen más nítida.

Como se ve en la figura 14, en las células infectadas hay un cambio en la distribución de la actina, siendo gradual con el tiempo (b, d y f), mientras en los controles tratados solamente con medio no hay un cambio en la distribución en la actina (a, c y e) al igual que en el experimento anterior.

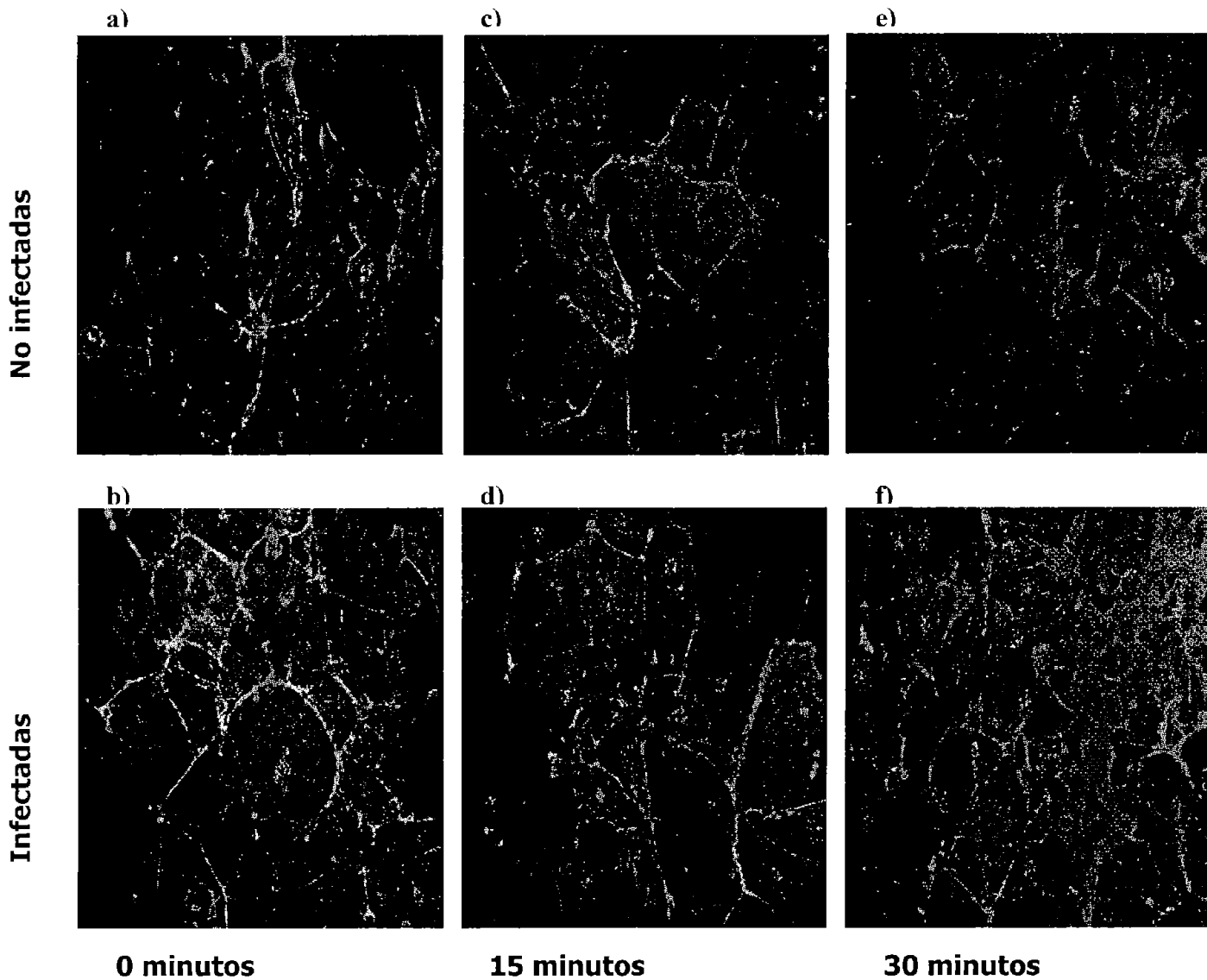


Figura 14. Microscopia confocal de células MA104 infectadas con RRV. Se muestran tres tiempos de la infección para cada una de las preparaciones. La actina se detectó como se explica en la figura 11. Se muestra un campo representativo de por lo menos 5 analizados para cada preparación.

Tratamiento de las células con Citocalacina D a diferentes tiempos.

Con el objeto de ver si el cambio en la distribución de la actina celular observado era producto de la entrada del rotavirus en las células se realizaron experimentos tratando a las células con citocalasina D para depolimerizar la actina, y después se infectaron con rotavirus RRV para ver si se observaba un cambio en la señal de la misma. Para esto primero se analizó la concentración de Citocalacina D necesaria para depolimerizar los filamentos de actina sin dañar severamente la morfología de las células. Las concentraciones probadas fueron de $1\mu\text{M}$, $3\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $7\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$ y se incubaron por 1, 2 ó 3 horas.

Como se puede ver en las figuras 15, 16 y 17, el tratamiento con citocalasina D a una concentración de $1\mu\text{M}$ fue la que disgregó los filamentos de actina sin modificar de manera sustancial la morfología de las células con respecto al control, siendo claro en la incubación por 1 hora. Los paneles correspondientes a las concentraciones de $3\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $7\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$, muestran que los filamentos de actina se disgregaron pero la morfología celular se ve afectada al verse las células pequeñas y sin un contorno definido.

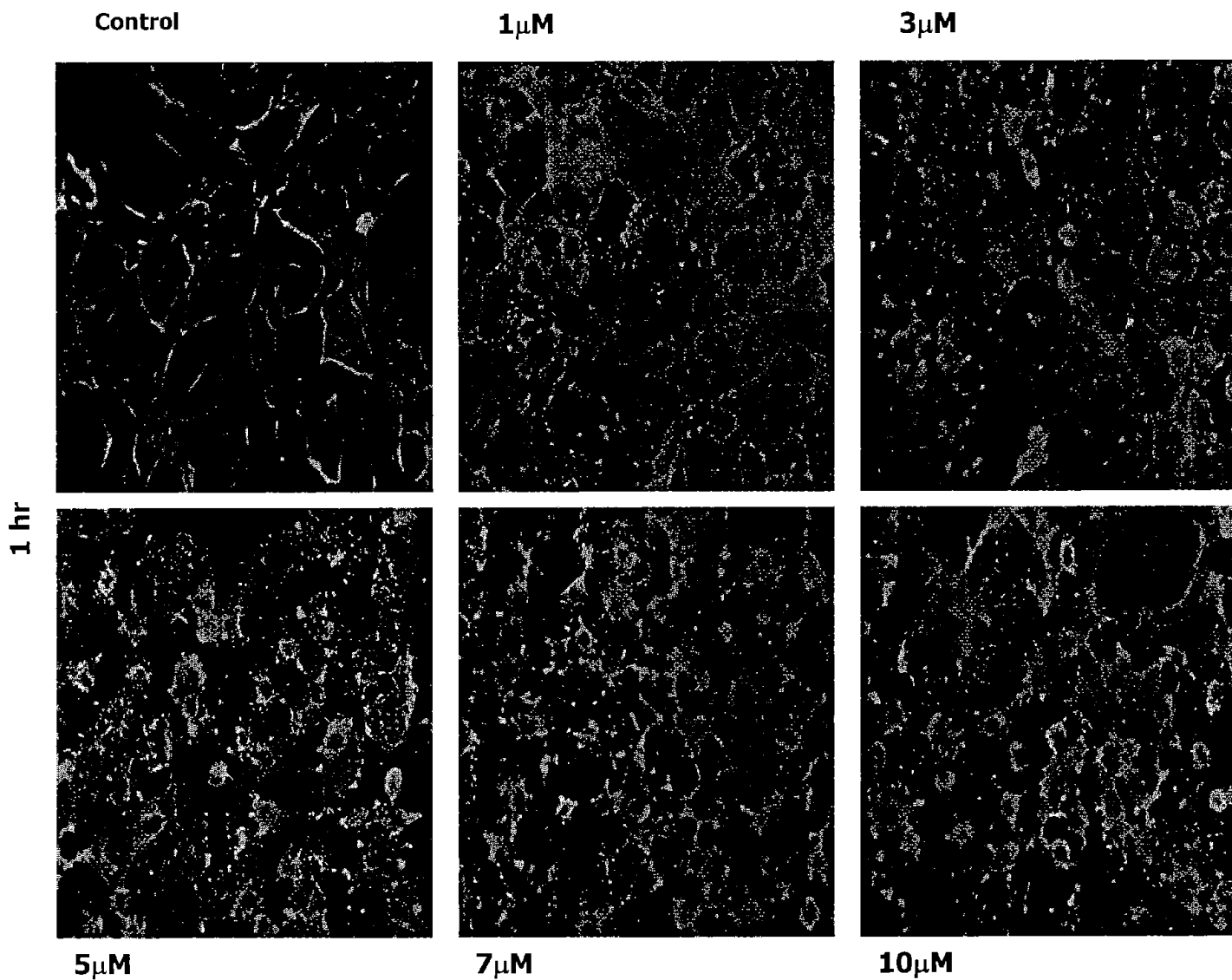


Figura 15. Células MA104 tratadas con citocalasina D por 1 hora con las concentraciones indicadas. La actina se detectó por inmunofluorescencia como se explica en materiales y métodos. Se muestra un campo representativo de por lo menos 5 analizados para cada preparación.

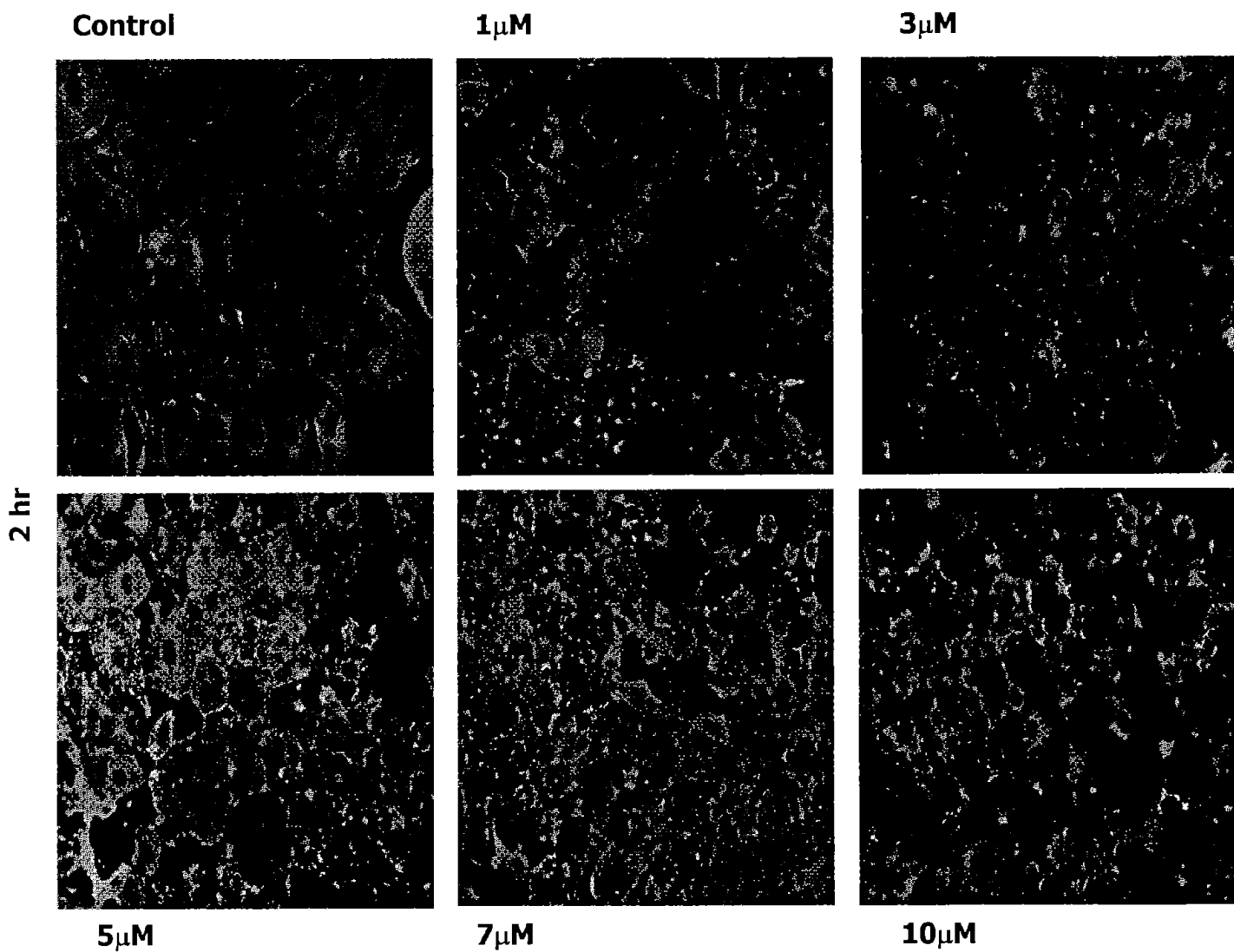


Figura 16. Células MA104 tratadas con citocalasina D a las dos horas a las concentraciones indicadas. Se muestra un campo representativo de por lo menos 5 analizados para cada preparación.

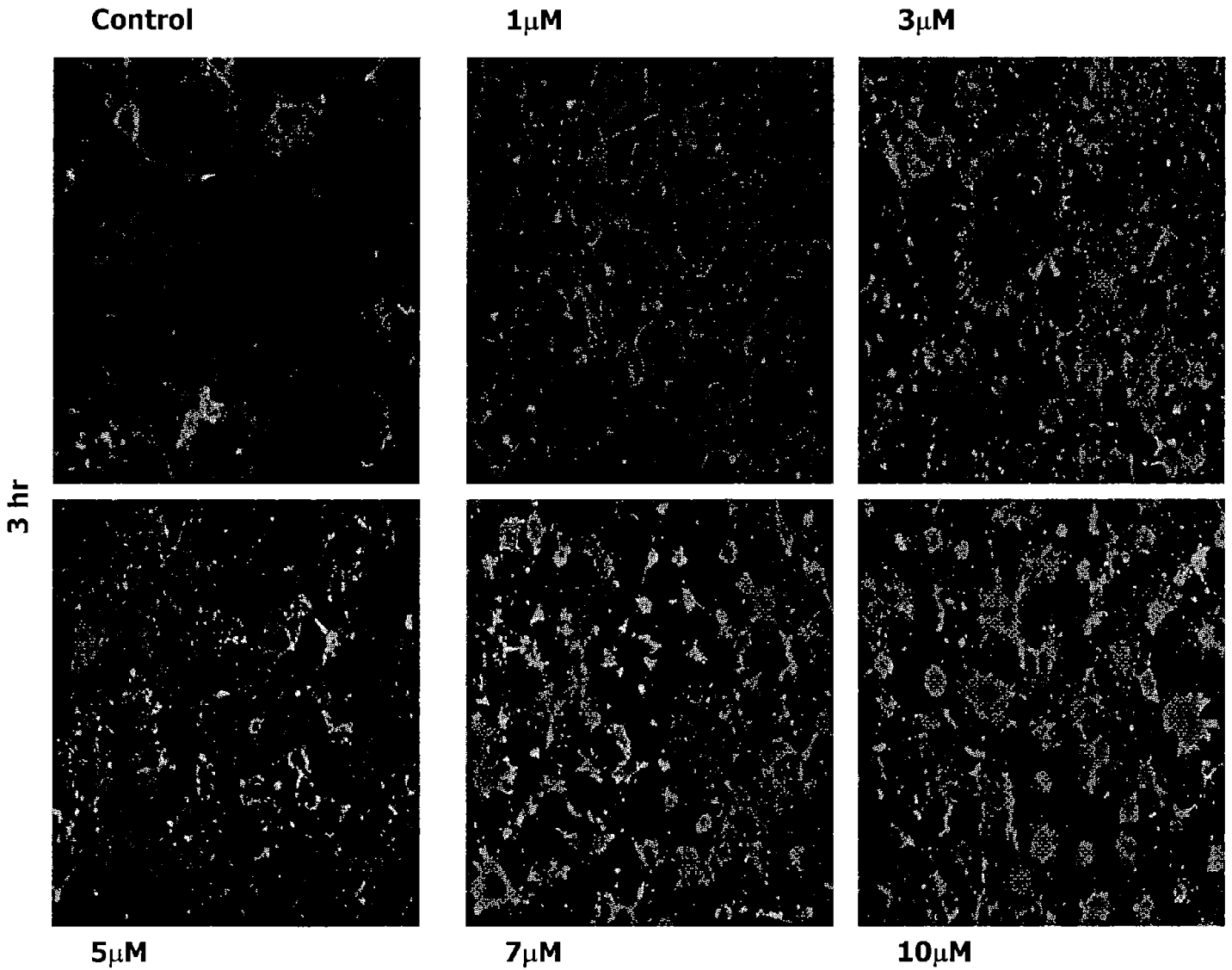


Figura 17. Células MA104 tratadas con citocalasina D a las 3 horas a las concentraciones indicadas. Se muestra un campo representativo de por lo menos 5 analizados para cada preparación.

Efecto de la infección por rotavirus en células MA104 tratadas con citocalasina D.

Una vez determinada la concentración de citocalasina D necesaria para disgregar la actina filamentosa sin afectar la morfología en las células ($1\mu\text{M}$ por 1 hora), se realizó un nuevo experimento de infección de las células MA104. Las células se trataron previamente con citocalasina D $1\mu\text{M}$ por 1 hora, posteriormente se infectaron con rotavirus y se procesaron las muestras a los 0, 15, 30, 45, 60 minutos y a las 6 horas. Como control se utilizaron células que solo fueron incubadas con medio MEM sin suero (figuras 18 y 19).

Es interesante el observar que en estas preparaciones que fueron tratadas con citocalasina D y posteriormente infectadas, también parece haber un cambio en la distribución de la señal de actina con respecto al control. Como puede verse en las figuras 18 y 19 en las preparaciones de 0, 15, 30, 45 y 60 minutos que fueron infectadas con RRV (b, d f, h y j), hay un cambio en la señal de actina, que no se observa en los controles tratados solamente con medio (a, c, e, g ,i). A las 6 horas (k) en todas las células se encuentra la proteína viral NSP5 (l), lo que es indicativo que todas las células estuvieron en contacto con virus y que por lo tanto la señal de actina detectada se debe a la interacción del virus con las células.

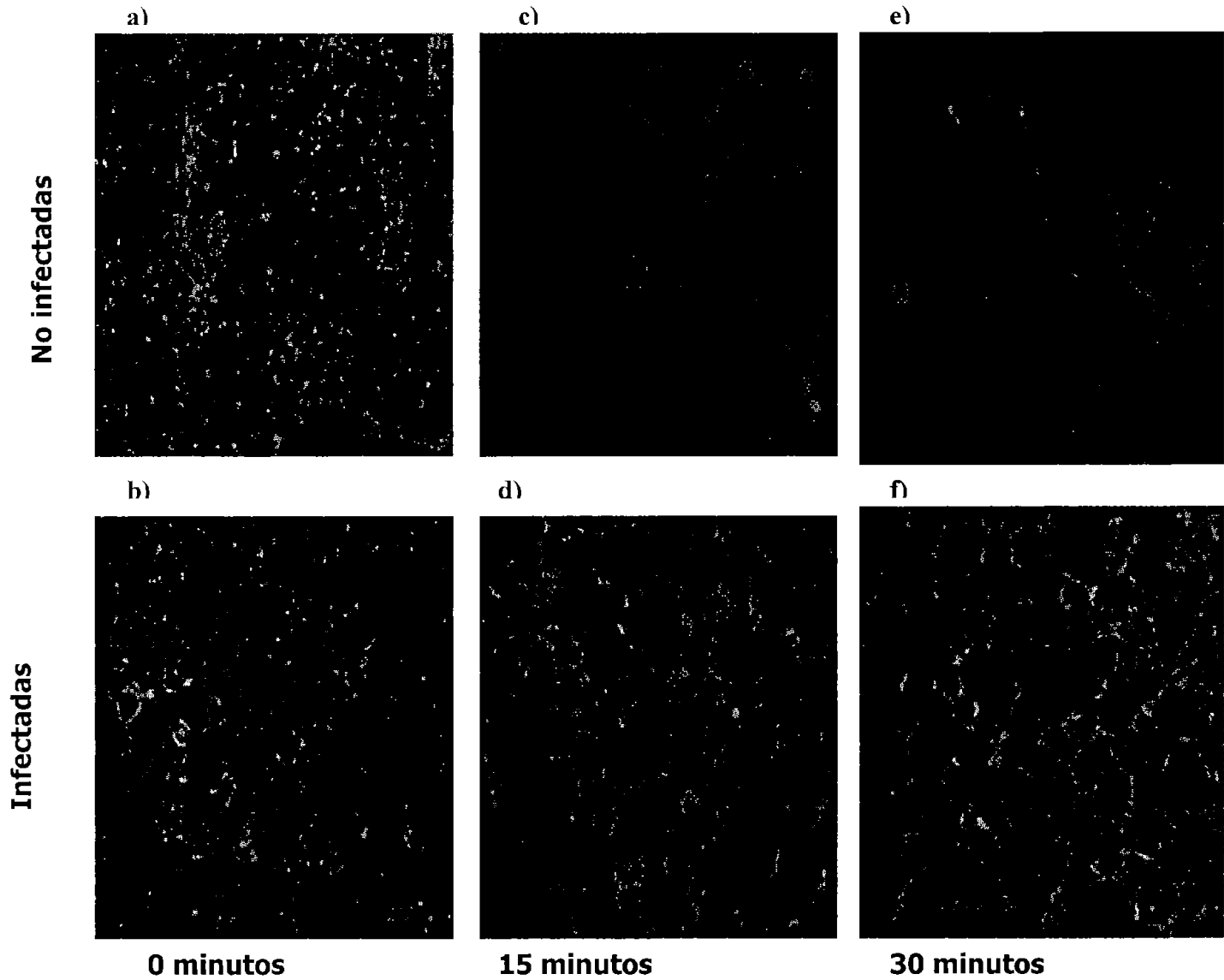


Figura 18. Efecto de la infección por rotavirus a los 0, 15 y 30 minutos sobre la actina celular en células tratadas con citocalasina D. Células MA104 crecidas en placas de 24 pozos a confluencia, se trataron con citocalasina D a una concentración de $1\mu\text{M}$ por una hora, se infectaron con RRV por 30 minutos a 4°C en presencia de la droga, se lavaron y se pasaron a 37°C procesando las muestras a los tiempos indicados para inmunofluorescencia. La actina se detectó como en la figura 11. Como control se utilizaron células que fueron tratadas solamente con medio. Se muestra un campo representativo de por lo menos 5 analizados para cada preparación.

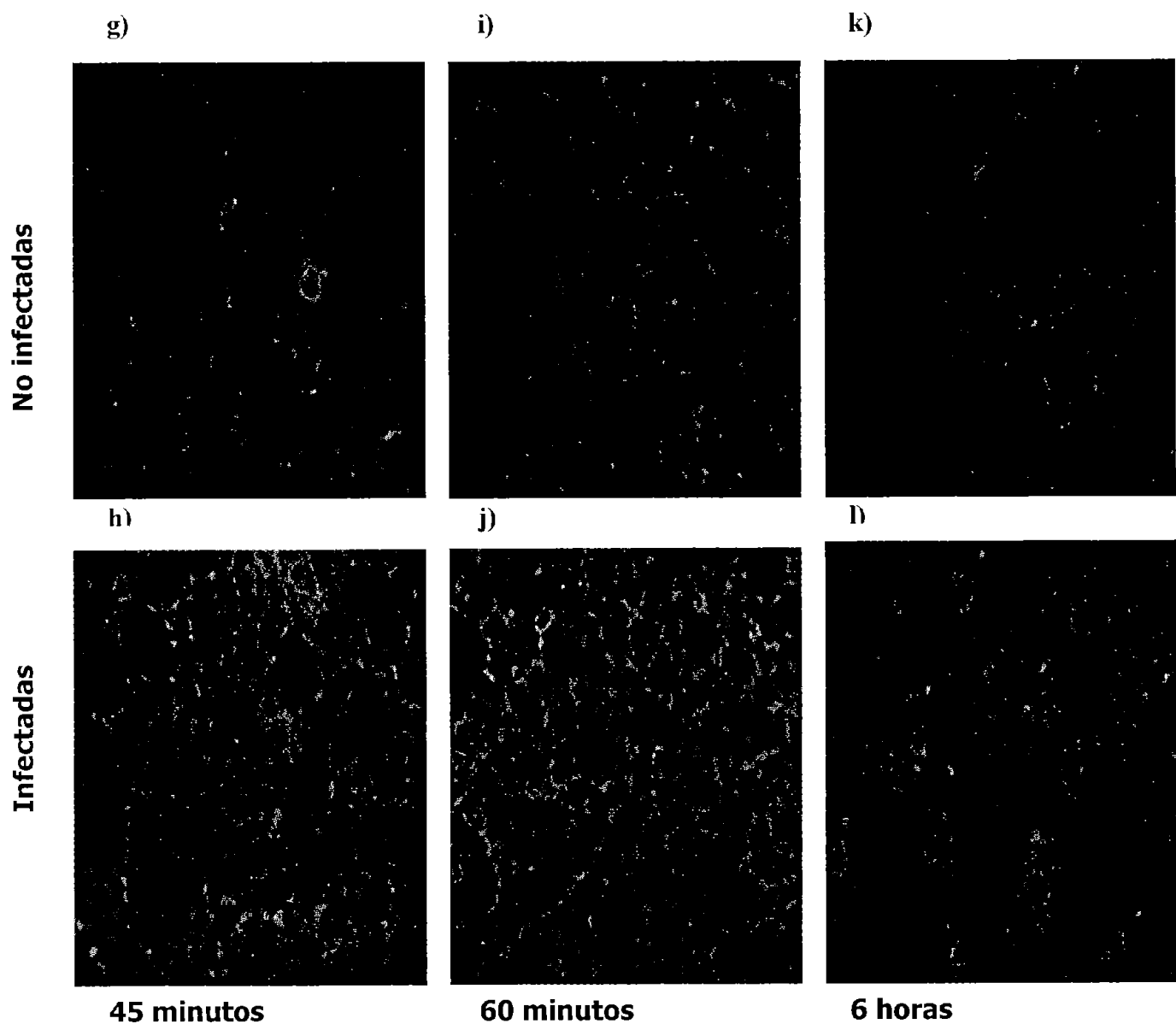


Figura 19. Efecto de la infección por rotavirus a los 45, 60 minutos y 6 horas sobre la actina celular en células tratadas con citocalasina D. Como control de infección se detectó la proteína viral NSP5 con un anticuerpo policlonal α -NSP5 y un anticuerpo secundario anti conejo-alexa 568. Se muestra un campo representativo de por lo menos 5 analizados para cada preparación

Discusión

Las modificaciones en el citoesqueleto de actina para la entrada de virus no envueltos como adenovirus (Li E. et al., 1998), herpesvirus, AAV (Adeno-Associated Viruses) (Smith G. & Enquist L., 2002) y algunas formas de vaccinia virus como IMV (intracellular mature virus) (Krijnse J. et al., 2000) se han descrito con detalle. Para estos se ha descrito que durante su entrada provocan cambios en la actina, permitiendo que el virus sea internado a la célula al promover que sus receptores sean reclutados hacia sitios específicos en la membrana celular y que una vez que es internado sea transportado hacia los sitios en donde su replicación se lleva a cabo. Sin embargo para otros virus no envueltos como los rotavirus, el estudio de la entrada a las células ha sido complejo y por ello existen muchos aspectos que se desconocen. A pesar de lo anterior las nuevas herramientas celulares y moleculares han permitido encontrar algunos de los elementos involucrados, pudiendo identificar a las proteínas virales VP4 y VP7 y algunas moléculas celulares como el ácido siálico, las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 3$, la proteína Hsc70 y más recientemente a la dinamina.

El papel de la actina en la entrada de los rotavirus a las células a lo largo del tiempo se ha mantenido como un aspecto controversial. Ya que en un trabajo se ve que hay un aumento de la infección en células murinas L cuando se tratan con citocalacina D y dansilcaverina (toxinas que específicamente afectan el citoesqueleto celular de actina), asociando a la actina como el mecanismo por el cuál los virus son atrapados dentro de vesículas incapacitándolos para poder desarrollar la infección (Bass et al., 1995). Sin

embargo, otro estudio muestra que si células MA104 se tratan con citocalacina D ó dansilcadaverina y posteriormente se infectan con rotavirus, la progresión de la infección se da de manera normal, por lo que se descalificó a la actina como importante en la entrada de los rotavirus a las células (Cuadras et al., 1997). Sin embargo en ese trabajo el tratamiento con citocalacina D fue por 3 horas y se dejó progresar la infección por 14 horas antes de realizar los análisis de infección. Si el efecto de la citocalacina D inhibió la infección por 3 horas, es posible el virus pudiera haber quedado en un paso en el que al ser retirada la citocalacina D la infección pudo continuar, pudiendo ser que durante las 14 horas restantes el virus pudiera haber infectado igual que en el control no tratado

En el presente trabajo se muestran experimentos que sugieren que la infección por rotavirus en células MA104 en cultivo provoca un cambio en la distribución de la actina celular durante los tiempos en los que la entrada de los virus a las células se pudiera estar dando. Dichos cambios pudieran ser necesarios para la entrada del rotavirus a sus células blanco, ya sea para reclutar proteínas importantes como la dinamina para la escisión de la vesícula de la membrana plasmática o bien, para el transporte intracelular de la vesícula que contiene al virus hacia el interior celular para la progresión de la infección. Sin embargo, hasta el momento no es claro como podría estar actuando la actina en este proceso, ni tampoco si el papel de la dinamina esta relacionado con el citoesqueleto de actina.

El estudio del papel de la actina y de otras moléculas relacionadas en la entrada de los rotavirus, es un aspecto relevante a estudiar ya que el conocimiento obtenido permitirá conocer detalladamente como se desarrolla el proceso infeccioso, así como parte de la

biología del virus pudiendo desarrollarse en un futuro medidas efectivas para el control y erradicación de la infección.

Conclusiones

- En la línea celular de riñón de mono denominada MA104, se estandarizaron las cantidades y tiempos de infección para el virus RRV (*Rhesus rotavirus*) así como el protocolo para la detección de la actina mediante la técnica de inmunofluorescencia.
- La infección de células MA104 con el virus RRV en los tiempos en los que la entrada del virus puede llevarse a cabo (5 a 45 minutos) según la literatura, se observó un cambio en la distribución de la actina en el interior celular de manera progresiva.
- El incremento en la señal de actina celular pudo ser observado de manera detallada por microscopia confocal, observándose también una reorganización de la actina de manera gradual a lo largo de los tiempos de análisis.
- Se establecieron las condiciones de tratamiento a las células MA104 con citocalacina D, para depolimerizar la actina filamentosa en las células sin afectar de manera significativa la morfología celular.

- En células MA104 previamente tratadas con citocalacina D e infectadas con el rotavirus RRV, se observó un cambio en la distribución de la actina de manera gradual conforme transcurre el tiempo, lo que sugiere de manera más firme una importancia de la actina en el proceso.

Perspectivas

Dada la participación de una dinamina funcional en la entrada de los rotavirus a las células, así como la aparente implicación de la actina celular, el objetivo del trabajo será dirigido a observar si en realidad existe una interacción entre la activación de la dinamina y la polimerización de actina cuándo se da la infección del rotavirus. Para esto se podrían utilizar mutantes de la dinamina deficientes en su actividad de GTPasa (Damke et al., 1995), deficientes en su autoensamblaje con alta actividad endocítica (Sever et al., 1999) ó bien, versiones trucadas de la dinamina en su dominio SH3 y por lo tanto con incapacidad de asociación con las otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto, que puedan dar información acerca de la interacción entre la dinamina y el citoesqueleto de actina en la infección por rotavirus.

Asimismo, con el propósito de dilucidar de manera más detallada a las proteínas celulares implicadas en la entrada del rotavirus se podrá analizar, bajo condiciones similares a las realizadas en este trabajo, a otras proteínas que se han reportado interaccionan tanto con la dinamina como con la actina, como por ejemplo la cortactina, las sindapinas y las profilinas, que al interaccionar con la dinamina promueven cambios en los patrones de actina.

Bibliografía

1. Arias, C. F., Guerrero C. A., Méndez E., Zárate S., Isa P., Espinosa R., Romero P. & López S. 2001. Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s). p. 323, Gastroenteritis Viruses. John Wiley & sons, USA.
2. Arias, C. F., Isa P., Guerrero C. A., Méndez E., Zárate S., López T., Espinosa R., Romero P. & López S. 2002. Molecular Biology of Rotavirus Cell Entry. Archives of Medical Research. 33:356-61.
3. Arias, C. F. & López S. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: A Versaillesque dance. Trends in Microbiology. 12:271-78.
4. Arias, C. F., Romero P., Álvarez V. & López S. 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. Journal of Virology. 70:5832-39.
5. Bass D., Baylor M., Chen C. & Upadhyayula U. 1995. Dansylcadaverine and Cytochalasin D Enhance Rotavirus Infection in Murine L Cells. Intervirology. 212:429-37.
6. Brunet J. P., Jourdan N., Cotte-Laffette J., Linxe C., Géniteau-Legendre M., Servin A. & Quéro A, M. 2000. Rotavirus Infection Induces Cytoskeleton Disorganization in Human Intestinal Epithelial Cells: Implication of an increase in Intracellular Concentration. Journal of Virology. 74:10801-06.
7. Ciarlet M. & Estes M. K. 1999. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. Journal of General Virology. 80:943-48.
8. Conner S. & Schmid S. 2003. Regulated portals of entry into the cell. Nature. 422:37-44.
9. Cooper J. A. 1987. Effects of Cytochalasin D and Phalloidin on Actin. The Journal of Cell Biology. 105:1473-78.

10. Coulson B. S., Londrigan S. L. & Lee D. J. 1997. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a desintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proceedings in Natural Academy of Sciences. USA.* 94:5389-94.
11. Cuadras M., Arias C. F. & López S. 1997. Rotaviruses Induce an Early Membrane Permeabilization of MA104 Cells and Do Not Require a Low Intracellular Ca^{2+} Concentration To Initiate Their Replication Cycle. *Journal of Virology.* 71:9065-74.
12. Charpilienne A., Abad M. J., Michelangeli F., Alavarado F., Vasseur M., Cohen J. & Ruiz M. C. 1997. Solubilized and cleaved VP7, the outer glycoprotein of rotavirus, induces permeabilization of cell membrane vesicles. *Journal of General Virology.* 78:1367-71.
13. Chemello M. E., Aristimuño O. C., Michelangeli F. & Ruiz M. C. 2002. Requirement for a Vacuolar H^{+} -ATPase Activity and Ca^{2+} Gradient during Entry of Rotavirus into MA104 Cells. *Journal of Virology.* 76:13083-87.
14. Damke H., Goosen M., Freundlier S., Bujard G. & Schmid S. 1995. Tightly Regulated and Inducible Expression of Dominant Interfering Dynamin Mutant in Stably Transformed HeLa Cells. *Methods in Enzymology.* 257:209-20.
15. Estes M. K. 2001. Rotaviruses and their replication. En *Fields Virology*, Cuarta edición (Knipe, D. M. y Howley, P. M. ediciones), pp. 1747-85, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
16. Estes M. K. & Cohen J. 1989. Rotavirus gen structure and function. *Microbiology Reviews.* 53:410-49.
17. Henley J. R., Krueger E. W. A., Oswald B. J. & McNiven M. A. 1998. Dynamin-mediated Internalization of Caveolae. *The Journal of Cell Biology.* 141:85-99.
18. Isa P., López S., Segovia L. & Arias C. F. 1997. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain rotaviruses. *Journal of Virology.* 71:6749-56.

19. Jeng R. & Welch M. D. 2001. Cytoskeleton: Actin and endocytosis-no longer the weakest link. *Current Biology*. 11:691-94.
20. Jordan N., Brunet J. P., Sapin C., Blaiss A, Cotte-Laffeitte J., Forestier F., Quéro A. M., Trugnan G. & Servin A.L. 1998. Rotavirus Infection Reduces Sucrose-Isomaltase Expression in Human Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Virology*. 72:7228-36.
21. Kaljot K. T., Shaw R. D. Rubin D. H. & Greenberg H. B. 1988. Infectious Rotavirus Enters Cells by Direct Cell Membrane Penetration, not by Endocytosis. *Journal of Virology*. 62:1136-44.
22. Kessels M. M., Engqvist-Goldstein A., & Drubin D. G., 2000. Association of mouse Actin Binding Protein 1 (mAbp1/SH3P7), and Src Kinase target, with Dynamic Regions of the cortical Actin Cytoskeleton in Response to Rac1 Activation. *Molecular Biology of the Cell*. 11:393-412.
23. Kessels M. M., Engqvist-Goldstein A., Drubin D. G & Qualmann B. 2001. Mammalian Abp1, a Signal-responsive F-Actin-Binding Protein, Links the Actin Cytoskeleton to Endocytosis Via the GTPase Dynamin. *The Journal of Cell Biology*. 153:351-66.
24. Kessels M. M., & Qualmann B. 2002. Syndapins integrate N-WASP in receptor-mediated endocytosis. *The EMBO Journal*. 21:6083-94.
25. Krijnse L. J., Kuehn A., Schleich S., Rutter G., Hohenberg H., Wepf R. & Griffiths G. 2000. Entry of the two infectious forms of vaccinia virus at the plasma membrane is signaling-dependent for the IMV but not the EEV. *Molecular Biology of Cell*. 11:2497-511.
26. Krueger E. W., Orth J. D., Cao H. & McNiven M. A. 2003. A Dynamin-Cortactin-Arp 2/3 Complex Mediates Actin Reorganization in Growth Factor/stimulates Cells. *Molecular Biology of the Cell*. 14:1085-96.
27. Lamaze C., Dujeancourt A., Baba T., Lo C. G., Benmerah A. & Dautry-Varsat A. 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Molecular Cell*. 7:661-71.

28. Lanzetti L., Di Fiore P. P. & Scita G. 2001. Pathways linking Endocytosis and Actin Cytoskeleton in Mammalian Cells. *Experimental Cell Research*. 271:45-56.
29. Lee E. & De Camilli P. 2002. Dynamin at actin tails. *Proceedings in Natural Academy of Sciences*. 99:161-66.
30. Li E., Stupack D., Bokoch G. M. & Nemerow G. R. 1998. Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization by Rho family GTPases. *Journal of Virology*.72: 8806-12.
31. McNiven M., Cao H., Pitts K. R. & Yoon Y. 2000. The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *TIBS*. 25:115-20.
32. McNiven M., Kim L., Krueger E., Orth J., Cao H. & Wong T. 2000. Regulated Interactions between Dynamin and the Actin-binding Protein Cortactin Modulate Cell Shape. *The Journal of Cell Biology*. 151:187-98.
33. McNiven M., Baldassarre M. & Buccione R. 2004. The role of dynamin in the assembly and function of podosomes and invadopodia. *Frontiers in Bioscience*. 9: 1944-53.
34. Méndez E., Arias C. F. & López S. 1996. Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *Journal of Virology*. 70:1218-22.
35. Ochoa G. C., Slepnev V. I., Neff L., Ringstad N., Takei K., Daniell L., Kim W., Cao H., MacNiven M., Baron R. & De Camilli P. 2000. A Functional Link Between Dynamin and the Actin Cytoskeleton at Podosomes. *The Journal of Cell Biology*. 150:377-89.
36. Orth J. D., Krueger E, W., Cao H & MacNiven M. A. 2002. The large GTPase dynamin regulates actin comet formation and movement in living cells. *Proceedings in Natural Academy of Sciences*. 99:167-72.
37. Orth J. D. & McNiven M. A. 2003. Dynamin at the actin-membrane interface. *Current Opinion in Cell Biology*. 15:31-39.
38. Qualmann B., Kessels M. M. & Kelly R. 2000. Molecular Links between Endocytosis and the Actin Cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology*. 150:111-116.

39. Qualmann B, & Mellor H. 2003. Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases. *Biochemical Journal*. 371:233-41.
40. Sánchez-San Martín C., López T. D., Arias C. F. & López S. 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *Journal of Virology*. 78:2310-2318.
41. Sieczkarski S. & Whittaker G. 2002. Dissecting virus entry via endocytosis. *Journal of General Virology*. 83:1535-45.
42. Schafer D. 2002. Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Current Opinion In Cell Biology*. 14:76-81.
43. Sever S., Damke H. & Schmid S. 2000. Garrotes, Springs, Ratchets, and Whips: Putting Dynamin Models to the Test. *Traffic*. 1:385-92.
44. Sever S., Muhlberg A. B. & Schmid S. 1999. Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature*. 398:481-86.
45. Smith G. & Enquist L. 2002. Break ins and break outs: Viral interactions with the cytoskeleton of mammalian cells. *Annual Reviews of Cell Development and Biology*. 18:135-61.
46. Suzuki H., Kitaoka S., Konno T., Sato T. & Ishida N. 1985. Two modes of Human Rotavirus Entry into MA104 Cells. *Archives of Virology*. 85: 25-34.
47. Tihova M., Dryden K. A., Bellamy R. A., Greenberg H. B. & Yeager M. 2001. Localization of Membrane Permeabilization and Receptor Binding Sites on the VP4 Hemagglutinin of Rotavirus: Implications for Cell Entry. *Journal of Molecular Biology*. 314:985-92.
48. Urrutia R., Henley J. R., Cook T. & McNiven M. A. 1997. The dynamins: Redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases. *Proceedings in Natural Academy of Sciences. USA*. 94:377-84.
49. Weclawicz K., Kristensson K. & Svensson L. 1994. Rotavirus causes selective vimentin reorganization in monkey kidney CV-1 cells. *Journal of General Virology*. 75:3267-71.

50. Wiejak J. & Wyroba E. 2002. Dynamin: Characteristics, Mechanism of Action and Function. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 7:1073-80.
51. Zárate S., Espinosa R., Romero P., Méndez E., Arias C.F. & López S. 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *Journal of Virology*. 74:593-99.
52. Zárate S. 2002. Caracterización de los dominios funcionales de la proteína VP4 de los rotavirus. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología. U.N.A. M.
53. World Health Organization 2004. <http://www.who.int>.