



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO**

---

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL**

**ESTUDIO DE LA FORMACION Y CRECIMIENTO DE  
VIROPLASMAS DE ROTAVIRUS MEDIANTE LA  
ESTABILIZACION DE MICROTUBULOS**

**TESIS**

**PARA OBTENER :  
EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
EMMA RANGEL HUERTA**

**TUTOR:  
DR. LUIS PADILLA NORIEGA**

**COMITÉ TUTORAL:  
DR. GARY GARCIA ESPINOSA  
DRA. MARIA DE LOURDES JUAREZ MOSQUEDA**

**MÉXICO D.F.**

**2011**



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.

## FINANCIAMIENTO

LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS FUE FINANCIADA PARCIALMENTE POR LOS PROYECTOS:

-51029-Z DEL FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN PARA LA EDUCACIÓN DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA TECNOLOGÍA (CONACYT), MÉXICO.

-IN224809 E IN210906 DEL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INOVACION TECNOLOGÍA (PAPIIT), DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM).

AGRADEZCO AL CONACYT POR LA BECA OTORGADA CON EL REGISTRO 254736, DURANTE EL PERÍODO DE FEBRERO DE 2008 A ENERO DE 2010 (4 SEMESTRES DEL 2008-2 AL 2010-1).

## **AGRADECIMIENTOS**

AGRADEZCO A LOS DRS. CARLOS GUERRERO HERNÁNDEZ, POSDOCTORANTE ADSCRITO AL LABORATORIO, Y A RENATO LEÓN RODRÍGUEZ, TÉCNICO ACADÉMICO ADSCRITO AL LABORATORIO, POR EL APOYO TÉCNICO QUE ME BRINDARON PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.

-AGRADEZCO AL DR. LUIS PADILLA NORIEGA POR HABARME BRINDADO LA OPORTUNIDAD DE TRABAJAR EN SU LABORATORIO Y POR SU APOYO EN LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.

-AGRADEZCO AL JURADO POR LA REVISIÓN PRONTA DE ÉSTA TESIS, Y EN ESPECIAL A LA DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS POR SU EXAUSTIVA REVISION Y POR SUS VALIOSAS OBSERVACIONES.

III

---

## **AGRADECIMIENTOS**

*A TI QUE SIEMPRE ME APOYASTE EN MOMENTOS DIFÍCILES Y SIEMPRE ESTUVISTE PARA LEVANTARME; QUE SIEMPRE ESTEMOS JUNTOS POR EL RESTO DE NUESTRAS VIDAS...*

**...LAURO**

## PENSAMIENTO

*NO HAY QUE CONFUNDIR NUNCA EL CONOCIMIENTO CON LA SABIDURÍA. EL PRIMERO NOS SIRVE PARA GANARNOS LA VIDA; LA SABIDURÍA NOS AYUDA A VIVIR.*

*SORCHA SORCHA CAREY (1943-?)*

*PROFESORA DE ARTE CLÁSICO INGLÉS.*



## TEMARIO

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	28
<b>HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
<b>RESULTADOS</b> .....	38
<b>DISCUSIÓN</b> .....	67
<b>CONCLUSIONES</b> .....	81
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	82
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	83

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA <i>REOVIRIDAE</i>.</b> .....	4
<b>1.2 CARACTERÍSTICAS DE ROTAVIRUS DEL GRUPO A</b> .....	4
<b>1.3 CICLO REPLICATIVO</b> .....	7
<b>1.4 VIROPLASMAS.</b> .....	9
<b>1.5 NSP2.</b> .....	13
<b>1.6 NSP5.</b> .....	15
<b>1.7 INTERACCIÓN DE NSP2 CON PROTEÍNAS VIRALES Y COMPONENTES CELULARES</b> .....	15
<b>1.8 VARIABILIDAD ENTRE CEPAS.</b> .....	17
<b>1.9 EVIDENCIA DE LA ASOCIACIÓN DE MICROTÚBULOS CON ROTAVIRUS Y OTROS</b> <b>GÉNEROS VIRALES.</b> .....	18
<b>1.9.1 ASOCIACIÓN DE VIROPLASMAS CON CITOESQUELETO.</b> .....	18
<b>1.9.2 ASOCIACIÓN DE VIROPLASMAS Y CITOESQUELETO.</b> .....	19
<b>1.10 ANTECEDENTES DE LA DESPOLIMERIZACIÓN DE MICROTÚBULOS SOBRE EL</b> <b>CRECIMIENTO DE VIROPLASMAS.</b> .....	21
<b>1.11 CITOESQUELETO</b> .....	22
<b>1.11.1 MICROTÚBULOS</b> .....	23
<b>1.11.2 CONFORMACIÓN DE TUBULINA</b> .....	23
<b>1.11.3 DINÁMICA DE MICROTÚBULOS <i>IN VITRO</i>.</b> .....	25

## VII

<b>1.11.4 DROGAS QUE AFECTAN LA DINÁMICA DE FORMACIÓN DE</b>	
<b>MICROTÚBULOS.</b> .....	26
<b>2. JUSTIFICACION</b> .....	28
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	30
<b>4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	31
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
<b>5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.</b> .....	33
<b>5.2 MODELO DE INFECCIÓN <i>IN VITRO</i> .</b> .....	33
<b>5.3 INFECCIÓN.</b> .....	33
<b>5.4 ANTICUERPOS</b> .....	34
<b>5.5 MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA.</b> .....	35
<b>5.6 PROCESAMIENTO DE IMAGENES</b> .....	35
<b>5.7 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR CON CRISTAL VIOLETA.</b> .....	36
<b>5.8 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR CON AZÚL TRIPANO.</b> .....	36
<b>5.9 EXPRESIÓN DE NSP2 Y NSP5 UTILIZANDO EL SISTEMA HIBRIDO DE VACCINIA</b>	
<b>ARN POLIMERASA T7.</b> .....	37
<b>5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.</b> .....	37
<b>6. RESULTADOS</b> .....	38
<b>6.1 DIFERENCIAS EN LA FORMACIÓN DE VIROPLASMAS ENTRE LAS CEPAS SA11 Y</b>	
<b>RRV</b> .....	38

<b>6.2 VALIDACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE DOSIS UTILIZADAS DE NOCODAZOL Y TAXOL SOBRE MICROTÚBULOS.</b> .....	<b>43</b>
<b>6.2.1 VALIDACIÓN DEL EFECTO DE NOCODAZOL SOBRE MTs.</b> .....	<b>43</b>
<b>6.2.2 DETERMINACION DE DOSIS DE TAXOL A UTILIZAR.</b> .....	<b>45</b>
<b>6.2.2.1 VIABILIDAD CELULAR</b> .....	<b>45</b>
<b>6.2.2.2 EFECTO DE TAXOL SOBRE MTs.</b> .....	<b>46</b>
<b>6.2.2.3 DETERMINACION DE DOSIS DE TAXOL A UTILIZAR EN CÉLULAS INFECTADAS CON ROTAVIRUS.</b> .....	<b>49</b>
<b>6.3 EL TRATAMIENTO CON TAXOL O NOCODAZOL PREVIO A LA INFECCIÓN NO AFECTA EL SEMBRADO DE VIROPLASMAS PERO SI SU LOCALIZACIÓN.</b> .....	<b>50</b>
<b>6.4 EFECTO DE LA DESESTABILIZACIÓN DE MTs CON NOCODAZOL EN EL CRECIMIENTO DE VIROPLASMAS EN CÉLULAS INFECTADAS POR SA11 ó RRV</b> .....	<b>52</b>
<b>6.5 LA ESTABILIZACIÓN DE MTs CON TAXOL FAVORECE EL CRECIMIENTO DE VIROPLASMAS DE SA11.</b> .....	<b>55</b>
<b>6.6 LA ESTABILIZACIÓN DE MTs CON TAXOL AFECTA EL CRECIMIENTO DE VIROPLASMAS DE RRV.</b> .....	<b>57</b>
<b>6.7 LOS VLS DE ROTAVIRUS NO MIGRAN A LA REGIÓN PERINUCLEAR.</b> .....	<b>60</b>
<b>6.8 LA ALTERACIÓN DE MICROTÚBULOS CON TAXOL O NOCODAZOL TAMBIEN AFECTA EL TAMAÑO DE VLS.</b> .....	<b>62</b>
<b>6.9 OTROS COMPONENTES CELULARES INVOLUCRADOS EN LA FORMACIÓN Y CRECIMIENTO DE VIROPLASMAS.</b> .....	<b>65</b>

<b>6.9.1. LIPID DROPLETS</b> .....	<b>65</b>
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	<b>67</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>81</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>82</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>83</b>

**TABLA**

**TABLA 1.** Propiedades de proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus.

.....6

**GRÁFICAS**

<b>GRÁFICA 1.</b> Cinética de formación de viroplasmias de las cepas SA11 y RRV .	A
<b>GRÁFICA 2.</b> Efecto de taxol sobre la viabilidad de células BSC1 por el ensayo de cristal violeta.	45
<b>GRÁFICA 3.</b> Efecto de taxol sobre la viabilidad de células BSC1 por el ensayo de azul tripano.	46
<b>GRÁFICA 4.</b> Efecto de taxol sobre el tamaño de los viroplasmias en células BSC1 infectadas con SA11..	49
<b>GRÁFICA 5.</b> Efecto de nocodazol sobre viroplasmias en células BSC1 infectadas con las cepas SA11 ó RRV	54
<b>GRÁFICA 6.</b> Efecto del tratamiento con taxol durante distintos intervalos de tiempo sobre el área de viroplasmias en células BSC1 infectadas con SA11 ó RRV	57
<b>GRÁFICA 7.</b> Diferencias de migración al núcleo entre viroplasmias en células BSC1 infectadas con SA11 a las 18 hpi y VLS formados por co-expresión de NSP2 y NSP5.	62

## FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Estructura tridimensional y genoma de rotavirus.....	5
<b>FIGURA 2.</b> Viroplasmias y cinética de viroplasmias.....	11
<b>FIGURA 3.</b> Formación de VLS.....	13
<b>FIGURA 4.</b> Sitio catalítico de NSP2.....	14
<b>FIGURA 5.</b> Estructura de dímero de tubulina.....	25
<b>FIGURA 6.</b> Dinámica de inestabilidad de MTs.....	26
<b>FIGURA 7.</b> Cinética de formación de viroplasmias de las 8 a 18hpi con intervalos de 2h de las cepas SA11 y RRV.....	EL 41
<b>FIGURA 8.</b> Alteración de microtúbulos en células BSC1 no infectadas tratadas con Taxol y Nocodazol.....	44
<b>FIGURA 9.</b> Efecto de taxol sobre microtúbulos en células BSC1 no infectadas.....	48
<b>FIGURA 10.</b> Efecto de tratamiento con taxol o nocodazol previamente a la infección con rotavirus cepa SA11 sobre el sembrado de viroplasmias.....	51
<b>FIGURA 11.</b> Efecto de nocodazol sobre viroplasmias de las cepas SA11 y RRV. ....	53
<b>FIGURA 12.</b> Efecto del tratamiento con taxol 0.05 mM durante distintos intervalos de tiempo sobre el área de viroplasmias en células BSC1 infectadas con SA11.....	56
<b>FIGURA 13.</b> Efecto del tratamiento con taxol 0.05 mM durante distintos intervalos de tiempo sobre el área de viroplasmias en células BSC1 infectadas con RRV.....	59
<b>FIGURA 14.</b> Ubicación intracelular de Viroplasm Like-Structures (VLS) de SA11 formados por la expresión de las proteínas NSP2 y NSP5 en células BSC1.....	61
<b>FIGURA 15.</b> Efecto de taxol y nocodazol sobre VLS en células BSC1 en las que se expresa NSP2 y NSP5 a las 17 h post- transfección.....	64

**FIGURA 16.** Viroplasmias se asocian con LD..... 66

**FIGURA 17.** Modelo hipotético de la replicación de rotavirus..... 79

**ABREVIACIONES**

Å	Amstrong
ARNcd	ARN cadena doble
ARNcs	ARN cadena sencilla
ARNm	ARN mensajeros
ARV	Avian reovirus / Reovirus de ave
BTV	Bluetongue virus/ Virus de la lengua azul
Caco-2	Células epiteliales de intestino de humano
CAP	Caperuza
CV	Cristal Violeta
DLP	Doble- Layered Particle/ Partículas de doble capa
FV	Fabricas virales
h	Hora
HCV	Hepatitis C virus / Virus de la Hepatitis C
HIT	Histidine triad/ triada de histidinas
Hpi	Horas post-infeccion
kDa	KiloDalton
LD	Lipid Droplets/ gotas de lipidos
MAP	Microtubule-associated proteins / Proteína asociada a microtúbulos

MAP2	Microtubule-associated proteins/Proteína asociada a microtúbulos-2
MA104	Células epiteliales de riñón de mono verde africano
MTs	Microtúbulos
MTOCs	Microtubule organizing center/ Centros organizadores de MTs
$\mu$ M	Micromolar
MOI	Multiplicidad de infección
mM	Milimolar
MEM	Medio mínimo esencial de Eagle
MRV	Mammalian reovirus/ Reovirus de mamífero
NSP	Non Structural Protein/ Proteína no estructural
RI	Intermediario de replicación
RRV	Rotavirus Rhesus
SA11	Simian Agent-11
TLP	Triple-Layered Particle/ Partículas de tres capas
RE	Retículo Endoplásmico
<i>tsE</i>	Mutante de NSP2 sensible a la temperatura
vTF7-3	Virus vaccinia que expresa la ARN polimerasa T7
VLS	Viroplasm like-structures/ Estructuras similares a viroplasmos

## RESUMEN

Los rotavirus presentan un genoma de 11 segmentos de RNA de cadena doble (RNAcd) y una cápside icosaédrica de tres capas proteicas concéntricas. La replicación del genoma viral consiste en la producción de los RNAcd usando RNAm virales como molde, y ocurre simultáneamente con su encapsidación en cuerpos de inclusión citoplásmicos llamados viroplasmos. Interesantemente es posible producir estructuras similares a viroplasmos (VLS) co-expresando dos proteínas virales no estructurales, NSP2 y NSP5. Estudios previos demostraron que los viroplasmos se siembran en asociación al citoesqueleto de microtúbulos y crecen por fusión entre ellos. En este trabajo se determinó la cinética de formación y localización intracelular de viroplasmos de dos cepas de rotavirus, SA11 y RRV, al estabilizar microtúbulos con taxol, o al desestabilizarlos con nocodazol. Se demostró que al desestabilizar los microtúbulos los viroplasmos de ambas cepas se siembran pero no crecen, mientras que al estabilizarlos se favorece el crecimiento al menos de los viroplasmos de la cepa SA11, y se inhibe la migración a la región perinuclear de viroplasmos de ambas cepas. En contraste, los VLS requirieron de los microtúbulos para crecer, pero fueron incapaces de migrar a la región perinuclear. Estos datos demuestran que los microtúbulos son necesarios para el crecimiento y migración de los viroplasmos, pero no para el sembrado, y que proteínas virales diferentes de NSP2 y NSP5 son necesarias para la migración de los viroplasmos.

**ABSTRACT**

Rotaviruses have a genome of 11 double-stranded RNA segments enclosed in a triple-layered icosahedral capsid. The viral mRNAs are used as templates for genome replication, which occurs simultaneously with capsid assembly in cytoplasmic inclusion bodies known as viroplasm. Interestingly viroplasm-like structures (VLS) are formed by co-expression of the non-structural viral proteins NSP2 and NSP5. Prior studies demonstrated that viroplasm are seeded in association with the microtubule cytoskeleton and grow by fusion among them. In this study we determined the kinetics of formation and intracellular localization of viroplasm of two viral strains, SA11 and RRV, as well as the effect of microtubule stabilization with taxol or destabilization with nocodazole. We demonstrated that viroplasm of both viral strains are seeded but unable to grow upon microtubule destabilization. On the contrary, microtubule stabilization favored viroplasm growth, at least for SA11, and inhibited viroplasm migration to the perinuclear region for both strains. In contrast, VLS needed microtubules for growth, but were unable to migrate to the perinuclear region. These data demonstrate that microtubules are necessary for viroplasm growth and migration but not for seeding. In addition our data demonstrate that viral proteins different from NSP2 and NSP5 are needed for viroplasm migration.

# **ANTECEDENTES**

## **ESTUDIO DE LA FORMACIÓN Y CRECIMIENTO DE VIROPLASMAS DE ROTAVIRUS MEDIANTE LA ESTABILIZACIÓN DE MICROTUBULOS.**

### **1. INTRODUCCIÓN**

Las gastroenteritis infecciosas agudas son la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años en los países en desarrollo, con alrededor de mil millones de episodios diarreicos y entre cuatro y cinco millones de muertes por año (Parashar, *et al.* 2003) Rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae*, donde se incluyen 12 distintos géneros que son reconocidos por el Comité Internacional de Taxonomía de virus. Dentro del género Rotavirus se han identificado 8 grupos A-H que son idénticos morfológicamente pero no cruzan antigénicamente (Mertens, 2004). Los grupos de la A a la C infectan a humanos y todos los grupos infectan a animales (López, *et al.* 2004).

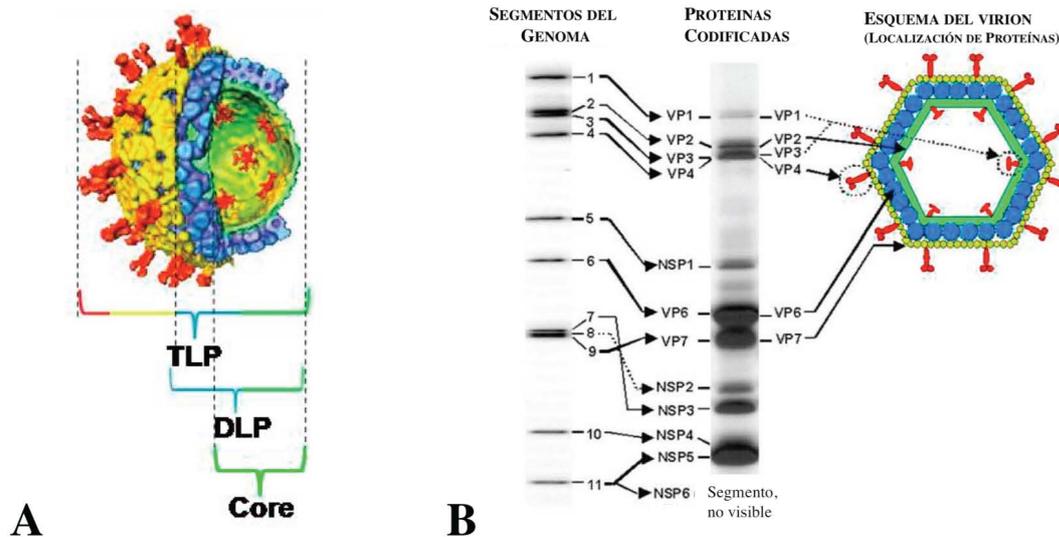
Rotavirus presenta un marcado tropismo a enterocitos maduros principalmente del intestino delgado; la infección resulta en lesiones citolíticas en las microvellosidades intestinales; distintos cortes histológicos muestran atrofia e hiperplasia de criptas intestinales y desprendimiento de enterocitos en las puntas de las microvellosidades (Mossel, *et al.* 2003). Existe evidencia que sugiere que la infección por rotavirus no solo se limita al intestino sino que la infección puede progresar a otros órganos como, linfonodos mesentéricos, hígado, bazo y riñones entre otros (Mossel, *et al.* 2003).

### **1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA REOVIRIDAE.**

Los virus de la familia *Reoviridae* son no envueltos y su genoma consiste de múltiples segmentos (10-12) de ARN de cadena doble (cd). Estos virus presentan una estructura icosaédrica que consiste de 3 capas concéntricas formadas por proteínas virales. Además de mamíferos y aves; existe una gran variedad de hospederos como insectos, plantas, peces, reptiles, arácnidos, hongos, artrópodos, y crustáceos (Mertens, 2004).

### **1.2 CARACTERÍSTICAS DE ROTAVIRUS DEL GRUPO A.**

Los rotavirus del grupo A fueron los primeros en descubrirse, y de los que más se conoce, y representan el grupo de mayor importancia médica y veterinaria (López, *et al.* 2004). Se clasifican en 15 serotipos G y 14 serotipos P, debido a las características antigénicas de las proteínas de la capa externa VP7 y VP4, respectivamente. Presentan una forma icosaédrica de 75 nm (100 nm incluyendo las espículas). Dentro de su ciclo replicativo se pueden identificar tres tipos de partículas virales con diferentes características estructurales y funcionales: i) la partícula infecciosa madura que contiene las tres capas proteicas, también llamada TLP (Triple-Layered Particle); ii) la partícula de dos capas proteicas o DLP (Doble- Layered Particle) esta partícula no es infecciosa, pero es transcripcionalmente activa; y iii) las partículas que contienen una sola capa de proteína o core, que tienen la actividad de replicar al genoma viral (Arias, *et al.* 2010) (Figura 1 A).



**FIGURA 1.** Estructura tridimensional y genoma de rotavirus. **A**, se muestran la partícula viral de rotavirus con sus tres capas proteicas, TLP, DLP y core (Prasad, *et al.* 1988). **B**, Patrón electroforético donde se muestran los 11 segmentos de ARNcd (panel izquierdo), los cuales codifican para 12 proteínas virales (panel centro) y la ubicación de las proteínas virales en la estructura de la partícula viral (panel derecho) mostrando las tres capas concéntricas

El virión contiene 11 segmentos de ARNcd, cada segmento codifica para una proteína excepto el gen 11 que contiene dos marcos abiertos de lectura traslapados, que codifican dos proteínas. Así el número total de proteínas virales es 12, de las cuales 6 son estructurales denominadas con el prefijo VP (Viral Protein) y 6 son no estructurales, denominadas con el prefijo NSP (Non Structural Protein) (Figura 1B y Tabla 1).

The dsRNA segments and proteins of simian rotavirus A/SA11 (genus *Rotavirus*: family Reoviridae)

Genome segment <sup>a</sup> (size, bp)	ORFs (bp)	Proteins (protein function <sup>b</sup> )	Protein size aa (Da)	Copy number/ particle	Location	Protein functions and properties
1 (3302)	18–3282	VP1 (Pol)	1088 (125005)	12	Inner capsid, five-fold axis	RNA-dependent RNA polymerase. Part of minimal replication complex. Virus specific 3'-mRNA binding. Part of virion transcription complex with VP3.
2 (2690)	17–2659	VP2 (T1)	880 (102431)	120	Inner capsid	Inner capsid structural protein. Non-specific ss & dsRNA-binding activity. Myristoylated. Cleaved. Part of minimal replication complex. Leucine zipper. Interacts with VP5.
3 (2591)	50–2554	VP3 (Cap)	835 (98120)	12	Inner capsid, five-fold axis	Guanylyltransferase. Methyltransferase. Basic Protein. Part of virion transcription complex with VP1. Non-specific ssRNA binding.
4 (2362)	10–2337	VP4	776 (86782)	120	Outer capsid (spike)	VP4 Dimers form outer capsid spike. Interacts with VP6. Virus infectivity enhanced by trypsin cleavage of VP4 into VP5* and VP8*.
	-	VP5*	529, 247–776 (60000)			Hemagglutinin. Cell attachment protein. P-type neutralization antigen. VP5* permeabilizes membranes. Crystal structure of VP8 fragment (galectin fold). TRAF2 signaling. Protection.
	-	VP8*	247, 1–247 (28000)			
5 (1611)	31–1515	NSP1	495 (58654)	0	N/S	Associates with cytoskeleton. Extensive sequence diversity between strains. Two conserved cysteine-rich zinc-finger motifs. Virus specific 5'-mRNA binding. Interacts with host IFN regulatory factor 3.
6 (1356)	24–1214	VP6 (T13)	397 (4816)	780	Middle capsid	Major virion protein. Middle capsid structural protein. Homotrimeric 4° structure. Subgroup antigen. Myristoylated. Protection (? Mechanism). Crystal structure available. Hydrophobic.
7 (1105)	26–970	NSP3	315 (34600)	0	N/S	Homodimer. Virus-specific 3'-mRNA binding. Binds eIF4G1 and circularizes mRNA on initiation complex. Involved in translational regulation and host shut-off. Crystal structures: NSP3 NH <sub>3</sub> fragment with 3'-viral RNA and NSP3 COOH fragment with eIF4G fragment.
8 (1059)	47–997	NSP2 (VIP)	317 (36700)	0	N/S	Non-specific ssRNA-binding. Accumulates in viroplasm. Involved in viroplasm formation with NSP5. NTPase activity. Helix destabilization activity. Functional octamer. Binds NSP5 and VP1. Regulates NSP5 autophosphorylation. Crystal structure (HIT-like fold).
9 (1062)	49–1026	VP7	326 (7368)	780	Outer capsid glycoprotein	Outer capsid structural glycoprotein. G-type neutralization antigen. N-linked high mannose glycosylation and trimming. RER transmembrane protein, cleaved signal sequence. Ca <sup>2+</sup> binding. Protection.
10 (751)	41–569	NSP4	175 (20290)	0	N/S	Enterotoxin. Receptor for budding of double-layer particle through ER membrane. RER transmembrane glycoprotein. Ca <sup>2+</sup> /Sr <sup>2+</sup> binding site. N-linked high mannose glycosylation. Protection. Host cell (Ca <sup>2+</sup> ) mobilization.
11 (667)	22–615	NSP5	198 (21725)	0	N/S	Interacts with VP2, NSP2 and NSP6. Homomultimerizes. O-linked glycosylation. (Hyper-) Phosphorylated. Autocatalytic kinase activity enhanced by NSP2 interaction. Non-specific ssRNA binding.
	80–355	NSP6	92 (11012)	0	N/S	Product of second, out-of-frame ORF. Interacts with NSP5. Localizes to viroplasm.

TABLA 1.- Propiedades de proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus (Mertens, 2004).

Los ARN mensajeros (ARNm) de rotavirus presentan caperuza (CAP) en su extremo 5', pero a diferencia de la mayoría de los ARNm celulares no tienen poli(A) en su extremo 3'. Su replicación se lleva exclusivamente en el citoplasma celular en donde forma cuerpos de inclusión llamados "viroplasmos" donde se lleva a cabo la replicación, empaquetamiento del genoma viral, y el ensamblaje de los DLPs.

Entre las cepas de rotavirus más estudiadas se encuentran dos provenientes de simio, SA11 (Simian Agent-11), aislado de un mono verde africano, y RRV (Rhesus rotavirus), aislado de mono Rhesus. En el laboratorio estas cepas se replican en dos líneas celulares derivadas de células epiteliales de riñón de mono verde africano (BSC1 y MA104), denominado "vervet monkey" en inglés (*Cercopithecus aethiops*), que son de las líneas celulares más susceptibles a la infección por rotavirus (Arias, *et al.* 2010).

### **1.3 CICLO REPLICATIVO**

La infección por rotavirus *in vivo* está restringida a las células de las puntas de las vellosidades del intestino delgado. La infección *in vitro* está limitada a líneas celulares epiteliales de origen renal tales como MA104 y BSC1. Ambas líneas son altamente permisibles a la infección por rotavirus y ha sido ampliamente utilizadas para caracterizar bioquímicamente a éste. Estudios recientes han caracterizado el ciclo replicativo de los rotavirus en una línea celular derivada de células provenientes de carcinoma de colon intestinal humano Caco-2. Estas células a

diferencia de las células MA104 tienen la capacidad de polarizarse. Se ha observado que en esta línea celular, el ciclo replicativo de rotavirus es más lento, encontrándose el máximo de producción viral a las 24 horas después de la infección (Fields, *et al.* 2007; Arias, *et al.* 2010). Estudios de microscopía electrónica de células polarizadas (Caco-2) e infectadas con rotavirus han mostrado algunas diferencias en la morfogénesis de rotavirus entre células polarizadas y no polarizadas (Arias, *et al.* 2010). Las características generales del ciclo replicativo de rotavirus son las siguientes (basado en estudios de cultivos celulares provenientes de riñón de mono):

1. La infección de la mayoría de las cepas virales requiere la adición de proteasas exógenas a el medio de cultivo. Esto garantiza la activación de la infectividad viral por la digestión de la proteína de la capa externa VP4.
2. El ciclo replicativo es exclusivamente en el citoplasma.
3. La partícula viral contiene todas las enzimas necesarias para llevar a cabo su replicación.
4. Los transcritos sirven para la síntesis de proteínas virales y como molde de ARNcd para la progenie viral.
5. La replicación se lleva a cabo en cuerpos electrodensos llamados viroplasmos.
6. Las DLPs asociadas con viroplasmos géman al retículo endoplásmico

(RE) para adquirir la tercer capa formando TLPs.

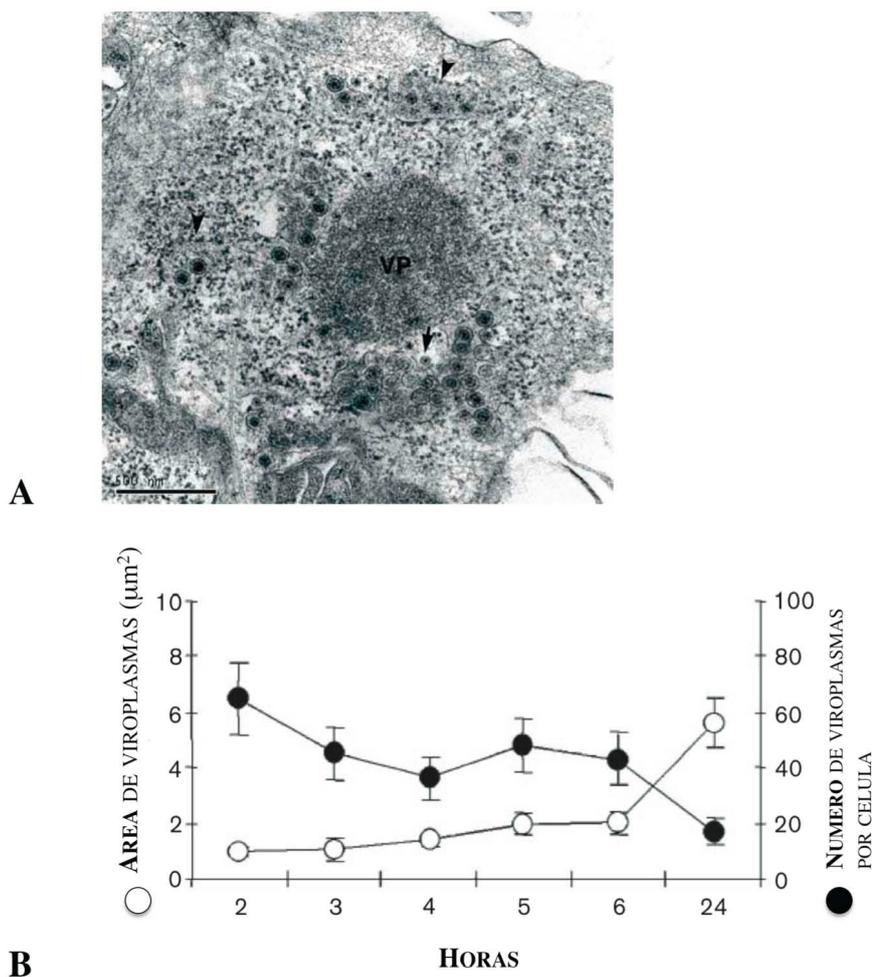
7. Los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular son importantes para controlar el correcto ensamble e integridad de la partícula viral.
8. Las partículas virales son liberadas por lisis celular.

En células polarizadas (Caco-2) la entrada de rotavirus ocurre exclusivamente en la región apical ó basolateral de la célula dependiendo de la cepa. La infección viral altera distintas funciones celulares tales como: tráfico de proteínas, citoesqueleto, uniones celulares, activación de cascadas de señales que desencadenen una respuesta inmune y secreción de varias citocinas. Finalmente la liberación del virus es a través de la región apical por una ruta independiente de Golgi (Fields, *et al.* 2007).

#### **1.4 VIROPLASMAS.**

Estudios de microscopia electrónica muestran que los viroplasmos son cuerpos de inclusión electro-densos compuestos de ARN viral y proteínas virales tales como VP1, VP2, VP3, VP6, NSP2 y NSP5, y frecuentemente se encuentran rodeados de numerosos polisomas que soportan la maduración de los viroplasmos (Figura 2A) (Petrie, *et al.*, 1984; Patton, 2006; Petrie, *et al.* 1982). La cinética de formación de viroplasmos muestra que en etapas tempranas son pequeños y numerosos, y conforme progresa la infección incrementan de tamaño y disminuyen en número sugiriendo su fusión (Eichwald, *et al.* 2004) (Figura 2B).

Las proteínas estructurales de rotavirus que forman parte de los viroplasmos tienen afinidad entre varias de ellas, y también con proteínas no estructurales. Estas interacciones pueden dirigir el ensamble de partículas similares al virión aún en ausencia de los propios viroplasmos. Por ejemplo, la co-expresión de componentes de la capa interna VP1, VP2, VP3 y VP6 mediante en el sistema de baculovirus en células de insecto, producen eficientemente DLPs vacíos (carecen de genoma viral) (Zeng, *et al.* 1996). Así mismo; la co-expresión de proteínas de las capas interna y externa (VP2, VP6, VP4 y VP7) llevan a la producción de TLPs vacíos (Kim, *et al.* 2002); no obstante, estas estructuras son incapaces de coordinar el empaquetamiento del genoma viral.

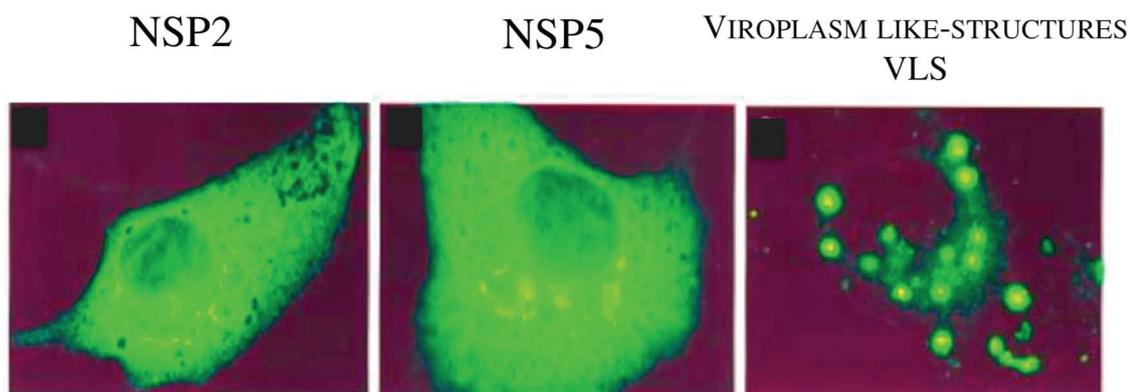


**FIGURA 2. A**, Viroplasmos electrodensos rodeados por vesículas del RE que contienen a TLPs acumulados durante la infección de rotavirus (Patton, *et al.* 2006) **B**, Cinética de formación de viroplasmos, se grafica el área y número de viroplasmos a lo largo de 24 hpi, y se observa que los viroplasmos aumentan de tamaño a la vez que disminuye su número (Eichwald, *et al.* 2004).

Se cree que la regulación de la replicación está dada por los principales componentes de los viroplasmos, NSP2 y NSP5 ya que es necesaria la co-

expresión de ambas proteínas para formación de estructuras similares a viroplasmos denominadas VLS (viroplasm like-structures) (Figura 3) (Fabbretti, *et al.* 1999). Así mismo recientemente se demostró que la co-expresión de NSP5 y VP2 también genera VLS, similares a los formados por NSP2 y NSP5, sin embargo son distribuidos de manera menos uniforme (Contin, *et al.* 2010). Experimentos en células infectadas con una mutante de NSP2 sensible a la temperatura (*tsE*), origina el desarrollo de viroplasmos maduros, pero acumula un excesivo número de partículas vacías, debido a lo anterior se propone que los viroplasmos son importantes para replicación y están ligados a la morfogénesis de los cores y los DLPs (Ramig, *et al.* 1984).

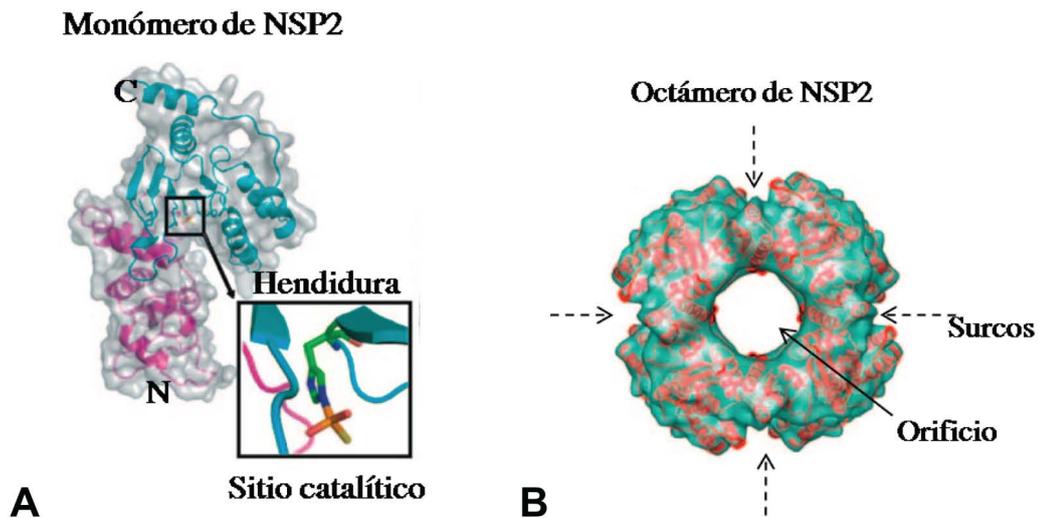
La importancia de los viroplasmos no sólo radica en la coordinación del empaquetamiento del genoma viral sino además en reclutar a las proteínas que forman los complejos de replicación de una manera espacial y temporal, la cual no queda aún del todo claro; ya que sin una adecuada formación y funcionamiento de los viroplasmos, la morfogénesis de las partículas virales produce estructuras vacías (Patton, *et al.* 2006).



**FIGURA 3.** Formación de VLS. Es necesaria la co-expresión de NSP2 y NSP5 para formación de VLS. Se observa que la sola expresión de NSP2 o NSP5 dá lugar a distribución difusa de la proteína, pero al ser co-expresadas éstas se condensan en VLS. (Fabbretti, *et al.* 1999).

### 1.5 NSP2.

NSP2 es una proteína de 317 aminoácidos y 35 kDa, tiene actividad de NTPasa, se une a ARNcs. En su extremo C-terminal, presenta un dominio con varias histidinas conservadas llamado HIT, es el sitio catalítico para actividad enzimática como NTPasa (Figura 4) (Jayaram, *et al.* 2002; Kumar, *et al.* 2007; Taraporewala, *et al.* 2006 y 2001; Vasquez-Del Carpio, *et al.* 2006). Debido a su actividad de NTPasa se ha propuesto a NSP2 como un motor molecular que utiliza la energía derivada de la hidrólisis de dNTPs para facilitar el empaquetamiento del genoma viral.



**FIGURA 4.** Sitio de unión de NTP en NSP2. **A.** Monómero de NSP2, en el cuadro se indica la hendidura donde se localiza el sitio catalítico de NSP2 justo entre los dominios del extremo N (magenta) y C terminal (azul celeste) (Kumar, M., *et al.* 2007). **B.** Cristalografía del octámero de NSP2. **A,** se muestra la reconstrucción en 3D, a una resolución de 8 Å, que muestra una estructura en forma de dona y un orificio central de 35 Å, y en rojo se muestran las hélices alfa del octámero (Jiang, *et al.* 2006).

NSP2, además de ser la proteína no estructural más abundante en estos cuerpos de inclusión, se ensambla como un octámero en forma de “dona”, con surcos profundos con residuos básicos alineados en la periferia, y un orificio central de 35 Å (Figura 4B) (Kumar, *et al.* 2007). Dicho orificio contiene residuos de aminoácidos neutros y estudios sugieren que podría ser usado como un ambiente protectoro de ARNcd recién sintetizados que emergen de VP1, o como un conducto pasivo para su empaquetamiento durante el ensamble de VP2 a la capa

interna (Jiang, *et al.* 2006).

### **1.6 NSP5.**

NSP5 es una proteína ácida, altamente conservada de 198 aminoácidos rica en residuos de serina y treonina. NSP5 forma dímeros que se unen a ARN de cs y cd. En células infectadas NSP5 sufre modificaciones post-traduccionales tales como fosforilación en distintos grados, y O-glicosilación (Afrikanova , *et al.*, 1996; Patton, *et al.* 2006).

NSP5 presenta actividad de cinasa sin embargo esta función no es aún del todo clara. Se sabe que NSP2 juega un papel importante en la fosforilación de NSP5 y que la interacción *in vivo* con NSP2 produce una hiperfosforilación de NSP5 y la formación de VLS (Eichwald, *et al.* 2002 y 2004). Sin embargo, algunos autores revelan que cinasas y fosfatasas celulares contribuyen a la fosforilación de NSP5 (Taraporewala, *et al.* 2004).

### **1.7 INTERACCIÓN DE NSP2 Y NSP5 CON PROTEÍNAS VIRALES Y COMPONENTES CELULARES.**

A través de ensayos de co-inmunoprecipitación se estableció la unión de VP1 tanto con NSP5 como NSP2 (Arnoldi F. *et al.*, 2007), del mismo modo se determinó la asociación de NSP5 y VP2 (Berois M. *et al.*, 2003); estas interacciones dan lugar a la formación de intermediarios de replicación

denominado “core” que cataliza la síntesis de ARNcd (Schuck, *et al.* 2001).

Análisis de cristalografía muestran que tanto ARN como NSP5 se unen a los prominentes surcos en el octámero de NSP2 (Figura 4). Se ha propuesto que NSP5 pudiera coordinar la replicación y empaquetamiento del genoma, posiblemente como consecuencia de que compite con la unión del ARN a NSP2. También se ha sugerido que ésta función de NSP5 podría depender de la concentración de los transcritos nacientes, y de su afinidad a NSP2 en distintos tiempos durante el proceso de replicación (Jiang, *et al.* 2006).

Recientemente se estableció una clara asociación de NSP2 con dímeros de tubulina; a través de una reconstrucción de microscopía electrónica se determinó que tubulina está localizada tanto en el orificio como en los surcos del octámero de NSP2, produciendo una competencia entre tubulina, NSP5 y RNA por el sitio de unión a NSP2 (Martin, *et al.* 2010); sin embargo, la secuencia de unión y regulación entre dichas proteínas con NSP2 no es aún del todo clara.

Además de haberse establecido la asociación de NSP2 con tubulina, se observó en células MA104 infectadas con rotavirus de bovino, que la infección por rotavirus causa una despolimerización de MTs asociada a la formación de gránulos de tubulina, al mismo tiempo que NSP2 secuestra tubulina al interior de viroplasmos; proponiendo así, que los viroplasmos forman un centro organizador de MTs (MTOCs) secundario durante la infección. (Martin, *et al.* 2010).

Recientemente también se estableció la asociación de Lipid Droplets (LD) con

viroplasmias. Los LD son organelos involucrados en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, y se sabe por microscopía confocal que los viroplasmias muestran una co-localización con proteínas asociadas a LD, específicamente Perilipina A y Adipofilina. Además, los ARN virales, LD, y viroplasmias muestran una cercana asociación a través de co-migración en gradiente de iodixanol. Igualmente a través de siRNA específico de NSP5, se bloqueo su asociación particularmente, con perilipina. Sugiriendo que los viroplasmias aparentemente reclutan a los LD durante el transcurso de la infección (Cheung. *et al*, 2010).

### **1.8 VARIABILIDAD ENTRE CEPAS.**

Es importante enfatizar que se han encontrado diferencias moleculares entre cepas y grupos de rotavirus. Por ejemplo la NSP2 cepa SA11 de grupo A de rotavirus muestra un 35% de identidad en la secuencia nucleotídica con respecto a NSP2 cepa Bristol del grupo C. Detalles de la estructura atómica del octámero de ambas cepas muestran una conservada arquitectura del octámero; sin embargo, existen diferencias en las cargas moleculares de la superficie del octámero de ambas cepas; se demostró que la expresión de la proteína heteróloga es incapaz de formar viroplasmias; sugiriendo una complementariedad de cargas entre cada una de las proteínas que forman los viroplasmias lo cual probablemente le dan la especificidad y la restricción entre los distintos grupos de rotavirus (Taraporewala, *et al*. 2006). Así mismo recientes datos obtenidos en nuestro laboratorio muestran diferencias funcionales de NSP2 entre cepas, para

lo cual se necesita profundizar en su estudio.

## **1.9 EVIDENCIA DE LA ASOCIACIÓN DE MICROTÚBULOS CON COMPONENTES VIRALES EN CÉLULAS INFECTADAS CON ROTAVIRUS Y OTROS GÉNEROS VIRALES.**

### **1.9.1 ASOCIACIÓN DE VIROPLASMAS CON CITOESQUELETO.**

Trabajos anteriores describen alteraciones de citoesqueleto producidas por infecciones de rotavirus. En células Caco-2 (epitelio de intestino de humano) infectadas con la línea RRV de rotavirus se produce un incremento en  $[Ca^{2+}]$  provocando una desorganización tanto en microtúbulos (MTs) como en la red de vimentina (Brunet, *et al.* 2000). Recientemente se han realizado trabajos que están enfocados a establecer el papel que juegan los MTs en la replicación de rotavirus. En el modelo sugerido por Chwetzoff en células Caco-2, propone que la liberación de la partícula viral madura es a través de un mecanismo que requiere balsas lipídicas y citoesqueleto, indicando que proteínas asociadas a citoesqueleto pudieran estar regulando interacciones de VP4 con componentes de membrana (Chwetzoff, *et al.* 2006).

Recientemente Martin estableció que la despolimerización de MTs en células MA104 infectadas con rotavirus de bovino (RF) puede ser un mecanismo de evasión celular, en donde rotavirus secuestre la maquinaria celular inhibiendo la síntesis de proteínas celulares, y/o rutas de señalización que puedan estar involucradas en la respuesta celular a infecciones virales como la expresión de interferón (Martin. *et al.* 2010).

### 1.9.2 ASOCIACIÓN DE PROTEÍNAS DE REOVIRUS CON CITOESQUELETO.

El virus de la lengua azul (BTV), reovirus y rotavirus comparten múltiples características tales como la formación de cuerpos de inclusión similares a viroplasmos de rotavirus y asociación con componentes de citoesqueleto. Para la formación de cuerpos de inclusión, rotavirus requiere dos proteínas virales, NSP2 y NSP5; mientras que BTV requiere solo una, NS2 (Miller, *et al.* 2010; Taraporewala, *et al.* 2004); anteriormente se pensaba que los reovirus de mamífero requerían dos proteínas no-estructurales  $\mu$ NS,  $\sigma$ NS y una proteína estructural del core  $\mu$ 2 (Becker, *et al.* 2003; Miller, *et al.* 2003). Sin embargo recientemente se demostró que la expresión de la proteína no estructural  $\mu$ NS de reovirus, en ausencia del resto de proteínas virales, es capaz por sí sola de formar estructuras similares a fábricas virales (FV).  $\mu$ NS es capaz de interactuar con diversas proteínas virales en particular 4 estructurales que forman el core ( $\lambda$ 1-3 y  $\sigma$ 2), y 2 no estructurales ( $\sigma$ NS y  $\mu$ 2). Por esta razón  $\mu$ NS es considerada como proteína matriz o andamio de FV (Miller, *et al.* 2010).

A pesar de ser formados por un número distinto de proteínas estructurales y no-estructurales, la formación de cuerpos de inclusión de rotavirus, reovirus y/o BTV son funcionalmente equivalentes, e incluso comparten tres características particulares (Taraporewala, *et al.* 2008):

- 1) Las proteínas que forman los cuerpos de inclusión de dichos virus, incluyen al menos una proteína con actividad de unión a ARNcs. Para

reovirus, BTV y rotavirus, las proteínas de unión a ARNcs son  $\sigma$ NS, NS2, y NSP2, respectivamente. Estas proteínas son identificadas como componentes de complejos involucrados en la replicación de genoma viral.

2) Los cuerpos de inclusión de reovirus, BTV, y rotavirus incluyen un componente homomultimérico: NSP2 para rotavirus, NS2 para BTV, y  $\sigma$ NS para reovirus. El hecho de la formación de multímeros pudiera sugerir una actividad cooperativa en la unión a ARNcs; promoviendo el empaquetamiento del genoma viral a través del relajamiento de estructuras secundarias presentes en el ARN, que pudieran impedir la translocación del ARN+ dentro de los cores (Taraporewala, *et al.* 2008).

3) Los cuerpos de inclusión de rotavirus, reovirus y BTV incluyen componente con actividad de NTPasa y RTPasa.

Además de las distintas interacciones entre proteínas virales de cada uno de los géneros virales que forman las FV; para algunos miembros de la familia *Reoviridae* existe una clara asociación de componentes de citoesqueleto con FV. En el caso del virus BTV, se ha sugerido que MTs y vimentina no están involucrados en la morfogénesis de cuerpos de inclusión (Kar., *et al.* 2007). Para el caso de reovirus la proteína  $\mu$ 2 esta involucrada en la formación y organización estructural de las FV, anclando a éstas no sólo a los MTs sino también a vimentina, mediando así su traslado hacia la región peri-nuclear; así mismo  $\mu$ 2 se ha descrito como una proteína asociada a MTs (MAP viral) (Miller, *et al.*, 2010;

Parker, *et al.* 2002). Experimentos de reovirus al despolimerizar los MTs con nocodazol, muestran que las FV de reovirus de mamífero (MRV) se distribuyen a lo largo del citoplasma, sugiriendo que las FV de MRV requieren de una red intacta de MTs para que puedan unirse en grandes cuerpos de inclusión cerca del MTOC (Parker, *et al.* 2002). Así mismo, recientes estudios revelan que existen diferencias entre las cepas MRV y aviar (ARV), ya que la proteína andamio mNS de MRV necesita la interacción con proteínas del citoesqueleto para viajar a lo largo de MTs hacia el MTOC y poder formar grandes cuerpos de inclusión perinuclear; mientras que  $\mu$ NS de ARV es capaz de formar grandes cuerpos de inclusión sin la interacción con la red de MTs (Brandariz-Nuñez, *et al.* 2010; Parker, *et al.* 2002).

La propiedad de interacción con MTs esta comúnmente asociada a MAPs celulares que modulan la dinámica de inestabilización y polimerización de MTs, regulación del transporte de organelos, y el anclamiento de proteínas involucradas en transducción de señales. Existen otros virus que presentan MAPs virales, como tobamovirus de plantas, virus de mosaico de coliflor, el virus vaccinia y el virus herpes tipo 1 (Broering, *et al.* 2002 y 2004; Parker, *et al.* 2002). En el caso de NSP2 de rotavirus a pesar de que se ha determinado una asociación directa con tubulina no se sabe si NSP2 funciona como MAP viral.

#### **1.10 ANTECEDENTES DEL EFECTO DE LA DESPOLIMERIZACION DE MICROTÚBULOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE VIROPLASMAS.**

Recientemente en nuestro laboratorio Cabral-Romero consideró importante estudiar la participación de elementos celulares como MTs y filamentos intermedios con la formación de viroplasmos, dado que varios miembros de la familia *Reoviridae* basan su replicación y morfogénesis asociándose a componentes del citoesqueleto. En su trabajo demostró no sólo la co-localización sino que también por ensayos de co-inmunoprecipitación la asociación de tubulina con NSP2, utilizando sólo la cepa SA11. Por otra parte al inhibir el ensamble de los MTs con nocodazol, determinó a través de un estudio cualitativo, que al despolimerizar los MTs se interfirió el crecimiento de viroplasmos; concluyendo, que una red de MTs funcional es necesaria para el crecimiento de viroplasmos, debido a la asociación de NSP2 y NSP5 con MTs (Cabral-Romero, *et al.* 2006).

### **1.11 CITOESQUELETO**

El citoesqueleto conduce y dirige el tráfico intracelular de organelos, y transporta materiales desde un punto de la célula a otro. El citoesqueleto también sostiene la frágil membrana plasmática y proporciona el sostén mecánico que permite a la célula soportar el estrés sin ser destruida por los cambios ambientales.

El citoesqueleto contiene tres principales tipos de filamentos: los MTs, los filamentos de actina y los filamentos intermedios. Los tres tipos de filamentos del citoesqueleto se forman a partir de ensamblajes helicoidales de sus subunidades, que se autoasocian, utilizando combinaciones de contacto proteicos entre extremos y laterales. Las diferencias en la estructura de las subunidades y la

resistencia de las fuerzas que las unen generan las diferencias críticas en cuanto a estabilidad y propiedades mecánicas que caracterizan cada tipo de filamento (Alberts, *et al* 2002; Polard, *et al.* 2008).

### **1.11.1 MICROTÚBULOS.**

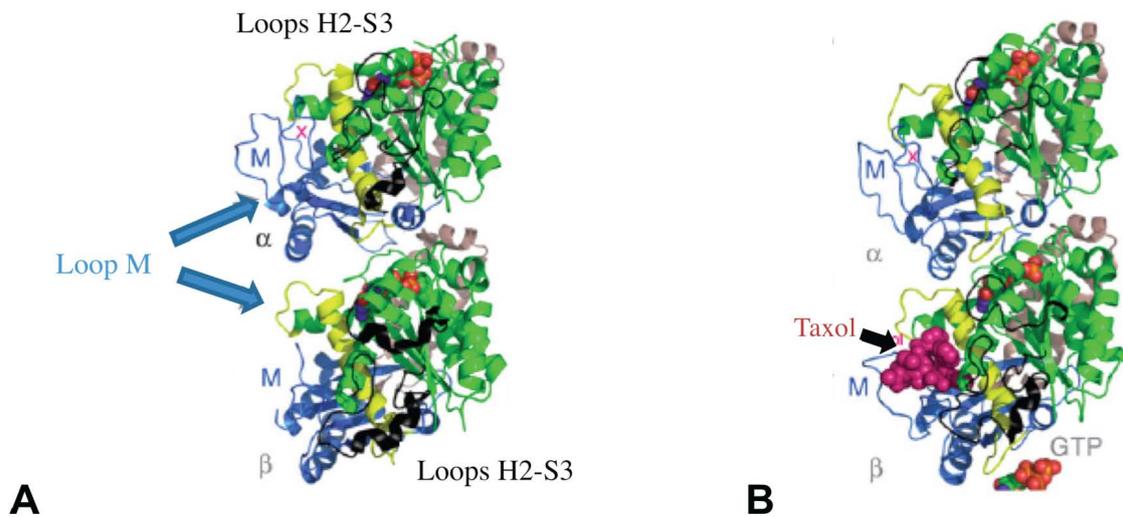
Los MTs son estructuras cilíndricas largas y huecas formadas por dímeros de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, su diámetro externo es de 25 nm y son mucho más rígidos que los filamentos de actina o los intermedios. Generalmente disponen de un extremo unido a un MTOC llamado centrosoma. La tubulina se halla en todas las células eucariontes y FtsZ se encuentra en todas las bacterias y arqueas. Las moléculas de tubulina tienen muchas isoformas, en los mamíferos existen al menos seis isoformas de tubulina  $\alpha$  y un número parecido de tubulina  $\beta$  (Polard, *et al.* 2008).

Los dos extremos del MT polimerizan a velocidades distintas, el extremo de crecimiento rápido se llama extremo más (+), mientras que el extremo lento se llama extremo menos (-). La asociación y disociación de tubulina ocurre solo en los extremos no en las paredes de los MTs, su crecimiento es más rápido en el extremo + que en el extremo -. (Alberts, *et al.* 2002; Polard, *et al.* 2008).

### **1.11.2 CONFORMACIÓN DEL DÍMERO DE TUBULINA.**

La molécula de tubulina es un heterodímero de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Los dímeros de tubulina  $\alpha$  y  $\beta$  son estables y raramente se encuentran disociados a las concentraciones de 10 – 20  $\mu$ M de tubulina presentes en la célula. Cada

subunidad de tubulina se encuentra unida a guanosin trifosfato (GTP) o guanosin difosfato (GDP). Cada complejo a y b tiene un lugar de unión para una molécula de GTP. El GTP unido a un monómero de tubulina a queda físicamente atrapado en la interfase del dímero y nunca puede ser hidrolizado o expulsado, a este sitio se le llama *sitio-N*; por el contrario, el nucleótido de la subunidad de tubulina b puede encontrarse tanto en forma de GTP como de GDP y puede ser hidrolizado, se le llama *sitio-E*. Cuando es incorporado un dímero a un MT, tiene contacto con a-tubulina adyacente incorporando el GTP en  $\beta$ -tubulina, promoviendo la hidrólisis. La hidrólisis de GTP unido al sitio de intercambio E en  $\beta$ -tubulina maneja la *dinámica de inestabilidad*. Cerca del centro de cada una de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se encuentra un importante loop llamado "M" que esta involucrado en las interacciones laterales de protofilamentos adyacentes a través de los loops H2-S3 y H1-S2, la unión de los tres loops ayudan a estabilizar y dar una cierta flexibilidad a los MTs (Figura 5) (Amos. *et al*, 2010) .

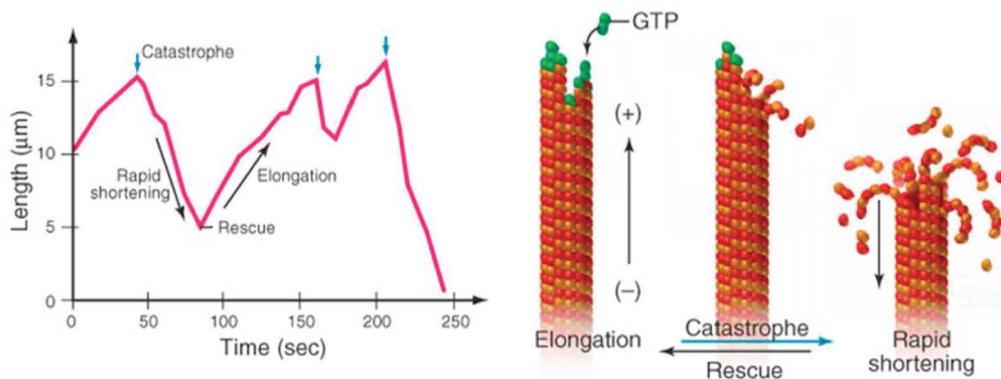


**FIGURA 5.** Esquema de dímero de tubulina donde se indica el monomero de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina. **A**, se indican los loops M, H2-S3 importantes en la estabilización de MTs. **B**, la flecha indica el sitio de unión de taxol en el loop M.

### 1.11.3 DINÁMICA DE MICROTÚBULOS *IN VITRO*.

*In vitro*, el total de la concentración de polímeros y monómeros de MTs son estables por un tiempo determinado, pero el número de MTs disminuye, e incluso algunos MTs desaparecen y algunos otros se hacen más largos, llamándose a este comportamiento *dinámica de inestabilidad*. De una manera asombrosa, el crecimiento y acortamiento de MTs co-existe en el estado estable "*steady-state*". En el estado estable un MT crece lentamente hasta que sufren una fase de acortamiento rápido llamada *catástrofe*, en esta fase se pierden aproximadamente 1000 dímeros por segundo, así que el polímero es acortado más de 0.5  $\mu\text{m}$  por segundo. El rápido acortamiento puede ser terminado por otro evento estocástico

llamado *rescate*, el rescate se lleva a cabo más comúnmente en el extremo (-) que en el extremo (+) (Figura 6) (Alberts, *et al.* 2002; Polard, *et al.* 2008).



**FIGURA 6.** Dinámica de inestabilidad de MTs. Se muestra la dinámica de inestabilidad de MTs, del lado izquierdo una representación gráfica de los eventos de catástrofe, rápido acortamiento, rescate y elongación, medida en segundos. El panel de la derecha es la representación de cómo ocurren cada uno de los eventos en la dinámica de inestabilidad (Polard, *et al.* 2008).

#### 1.11.4 DROGAS QUE AFECTAN LA DINÁMICA DE FORMACIÓN DE MICROTÚBULOS.

Las herramientas farmacológicas permiten estudiar la dinámica de formación de MTs, y actualmente el uso de drogas que bloqueen la fase de mitosis en la célula son utilizadas ampliamente para tratamiento contra el cáncer (Polard, *et al.* 2008). La inhibición de la mitosis por muchas drogas que se unen a tubulina es atribuida a la despolimerización de MTs. El nocodazol afecta la dinámica de polimerización y despolimerización de MTs *in vitro* incrementando 4 a 5 veces la hidrólisis de GTP en la despolimerización de los MTs (Jordan, *et al.* 1992).

El taxol es una droga que promueve la estabilización de MTs, y como resultado la división celular se estaciona en la fase de G<sub>2</sub>/M (Shannon, *et al* 2005). El taxol se une a la subunidad-b del dímero de tubulina resultando en un MTs estable contra la despolimerización inducida por Ca<sup>2+</sup>, frío y dilución. El taxol se une detrás del loop-M en la subunidad-β del dímero de tubulina. Se ha postulado que el taxol ayuda a facilitar las interacciones entre el loop-M de la subunidad-β con el loop H1-S2 de la subunidad β del protofilamento adyacente. Un mecanismo que se ha propuesto de cómo estabiliza los MTs el taxol, es la unión de taxol a las interacciones dímero-dímero de tubulina que forman los protofilamentos de esta manera fortaleciendo el MTs y evitando su despolimerización (Figura 5) (Mitra, *et al.* 2008; Derry, *et al.* 1997).

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

DETERMINAR EL EFECTO DE LA ESTABILIZACIÓN Y DESESTABILIZACIÓN DE MTs SOBRE LA FORMACIÓN, CRECIMIENTO Y MIGRACIÓN DE VIROPLASMAS Y VLS EN DOS CEPAS DE ROTAVIRUS.

#### **4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

4.1.1 Caracterizar el número y tamaño de viroplasmas de las cepas SA11 y RRV de rotavirus durante el proceso de infección en células BSC-1 (2-18 h horas post-infección).

4.1.2 Determinar el efecto de taxol y nocodazol en la formación y crecimiento de viroplasmas.

4.1.2.1 Estandarización de la dosis de taxol a utilizar, en células sin infectar o infectadas con rotavirus SA11.

4.1.2.2 Validación de la actividad de nocodazol a dosis de 15 µg/ml en células no infectadas.

4.1.2.3 Efecto de taxol y nocodazol en la formación y crecimiento de viroplasmas en etapas tempranas de la infección de las cepas SA11 ó RRV de rotavirus.

4.1.3 Determinar el efecto de taxol y nocodazol en la formación y crecimiento de VLS.

4.1.3.1 Caracterización del proceso de migración de VLS.

4.1.3.2 Efecto de taxol sobre VLS.

4.1.3.3 Efecto de nocodazol sobre VLS.

4.1.4 Identificación de otros factores del hospedero que puedan afectar la formación y crecimiento de viroplasmos.

4.1.4.1 Lipid Droplets.

### **3. HIPÓTESIS**

LA ALTERACION DE LA DINÁMICA DE POLIMERIZACIÓN – DESPOLIMERIZACIÓN DE MTS MEDIANTE LA EXPOSICIÓN A NOCODAZOL Ó TAXOL MODIFICA EL CRECIMIENTO Y FUSIÓN DE VIROPLASMAS Y VLS DE ROTAVIRUS. DEBIDO A LAS DIFERENCIAS REPORTADAS ENTRE CEPAS SE PROPONE QUE EXISTAN DIFERENCIAS EN EL PROCESO DE FORMACIÓN Y CRECIMIENTO DE VIROPLASMAS ENTRE LAS CEPAS SA11 Y RRV.

## 2. JUSTIFICACION

Debido al papel tan importante que tienen las diarreas causadas por rotavirus tanto en humanos como en animales, es importante desarrollar estrategias de tratamiento eficientes que ayuden a controlar las infecciones causadas por rotavirus, por eso es importante conocer los mecanismo moleculares que el virus utiliza para su replicación. Para ello en este trabajo se determinó el papel que juegan los MTs en la formación, crecimiento y migración de viroplasmos en dos de las cepas de rotavirus más utilizadas en el laboratorio (SA11 y RRV) así como el crecimiento y migración de VLS, determinando el efecto de drogas que afectan la dinámica de los MTs, y el taxol que estabiliza a los MTs y cuyo efecto sobre los viroplasmos se desconocía antes de la realización de este estudio.

## **5. MATERIALES Y METODOS**

### **5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL**

*Es un estudio ampliado para determinar la importancia de MTs sobre la formación, crecimiento y migración de viroplasmias, en células BSC1 infectadas con rotavirus SA11 ó RRV a distintos tiempos post-infección, a través de drogas que estabilizan y desestabilizan los MTs; taxol y nocodazol, respectivamente. También se estableció la formación de VLS producidos por expresión, mediante el sistema híbrido de vaccinia, de las proteínas NSP2 y NSP5. Igualmente se ratificó la asociación de LD con viroplasmias.*

### **5.2 MODELO DE INFECCIÓN *IN VITRO* .**

Células BSC-1 epiteliales de riñón de mono verde africano fueron sembradas en placas de 16 pozos (Nunc™, Lab- Tek®Brand Products) en medio de cultivo modificado de Eagle (MEM, Invitrogen) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (Invitrogen), 3% de Bicarbonato, 1X de Penicilina/Estreptomicina (Invitrogen ) y 1x de GlutaMAX (Invitrogen). Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific, CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator) hasta su confluencia.

### **5.3 INFECCIÓN.**

Las células BSC1 fueron infectadas con las cepas:

CEPAS DE ROTAVIRUS	TÍTULO Y MOI
<b>SA11</b> (Simian Agent-11) aislado de un mono verde africano	( $4.6 \times 10^7$ UFF/ml) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1.
<b>RRV</b> (rhesus rotavirus) aislado de un mono rhesus	( $2.8 \times 10^7$ UFF/ml) a una MOI de 0.05.

La infección con dichas cepas se dejó durante 1 hora (h) de adsorción a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> se eliminó el inóculo no absorbido, se dejó la infección por 17 h adicionales, y se lavó 2 veces con solución buffer de fosfatos (PBS), para su posterior fijación y procesamiento para inmunofluorescencia.

#### 5.4. ANTICUERPOS.

ANTICUERPOS	DILUCIÓN
-Anti $\beta$ -tubulina (Mouse Anti-bIII Tubulin, Promega, No. catalogo G7121)	1:1000
-Anti-NSP2 (de cuyo producido en el laboratorio)	1:300
-Anti-IgG de cuyo-Alexa Fluor® 594 (anti-guinea pig IgG H+L, Invitrogen) para NSP2 .	1:200

-Anti-IgG de ratón- Alexa Fluor® 488 (goat anti-mouse IgG H+L, InvitrogenNo. catalogo A-11001) para $\beta$ -tubulina.	1:200
-Anti-perilipina (Perilipin (K-13), goat polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology))	1:80

### 5.5 MICROSCOPIA DE INMUNOFLORESCENCIA.

Células BSC1 fueron infectadas por 18 h con las cepa SA11 y/o RRV. Se fijaron las células con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1%, y se bloqueó con albumina sérica bovina al 1%. Se adicionó el anticuerpo primario y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó el anticuerpo secundario y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente el núcleo se tiñó con DAPI stock 0.5 mg/ ml a una dilución 1: 1000 y las laminillas se colocaron en medio para montar DAKO (Dako Citomation).

### 5.6 PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.

Las muestras se analizaron por microscopia de inmunofluorescencia convencional (Microscopio OLIMPUS IX70) y microscopia confocal (OLIMPUS FV-1000). Las imágenes fueron analizadas con el software IMAGE PRO PLUS 6.2. y las

imágenes de microscopía confocal con el software FV10-ASW 1.7 Viewer.

#### **5.7 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR CON CRISTAL VIOLETA.**

Se sembraron células BSC1 en placas de 96 pozos y se incubaron por 4 días a 37°C. Posteriormente se agregaron diferentes concentraciones de taxol de 0.005  $\mu$ M a 50  $\mu$ M (Invitrogen), entre 4 a 18 h previas a la fijación. En seguida las células se lavaron con MEM sin suero y se agregó Cristal Violeta (CV 0.1 % en Etanol 20%), y se incubaron por 5 min., eliminando la solución para su posterior secado. La placa se solubilizó agregando SDS 0.2% y se incubó en agitación por ~2 a 3 h hasta que el colorante se disolvió. Finalmente se pasaron 100 ml de cada muestra a otra placa de ELISA y se leyó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm.

#### **5.8 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR CON AZUL TRIPANO.**

Se sembraron células BSC1 en placas de 6 pozos (Corning, Costar), a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, por 4 días y se trataron con distintas concentraciones de taxol de 0.005  $\mu$ M a 50  $\mu$ M (Invitrogen) por 18 h. Posteriormente las células fueron tripsinizadas y re-suspendidas en azul tripano al 1% en una proporción 1:1 con las células resuspendidas en medio MEM sin suero, y fueron contabilizadas en un hemocitómetro de Neubauer.

### **5.9 EXPRESIÓN DE NSP2 Y NSP5 UTILIZANDO EL SISTEMA HÍBRIDO DE VACCINIA/ ARN POLIMERASA T7.**

El sistema se basa en la expresión de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 y la co-transfección con los plásmidos pNSP2 y pNSP5 (Cabral-Romero 2006), para la expresión de NSP2 y NSP5 de la cepa SA11 a partir de un promotor T7. Se sembraron células BSC1 en placas de 16 pozos y se incubaron hasta su confluencia mediante el método anteriormente descrito. Posteriormente se infectaron con vaccinia vTF7-3 ( $4 \times 10^9$  UFP/ml) a una MOI de 1 para la expresión de la ARN polimerasa T7 (Elroy-Stein, *et al.* 1998), 1 h post-infección se co-transfectó con los plásmidos (p) pNSP2 y pNSP5 a una concentración de 60 ng/pozo, el método de transfección se realizó con lipofectamina, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen), y además se trataron o no con taxol 0.05  $\mu$ M, ó nocodazol 15  $\mu$ g/ ml se incubaron por 17 h. Finalmente las células se fijaron y se montó la laminilla para inmunofluorescencia como se describió anteriormente.

### **5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa JMP (*Statistical Discovery Sofyware*). Se contabilizaron tres experimentos diferentes con 10 observaciones cada uno.

Todos los datos se distribuyeron de manera normal con la prueba de Shapiro-Wil

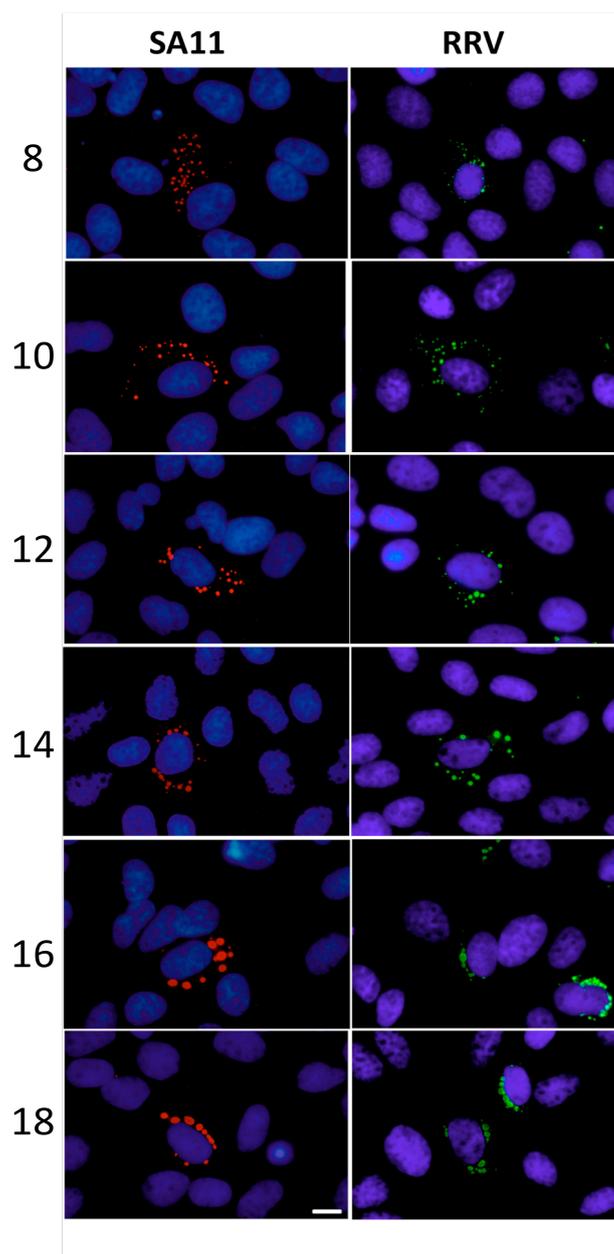
W; (W 0.963746 / Prob<W 0.5945). Análisis de Varianza  $p < .001$ . Las diferencias estadísticas se midieron con la prueba de Tukey HSD y T de Student.

## 6. RESULTADOS

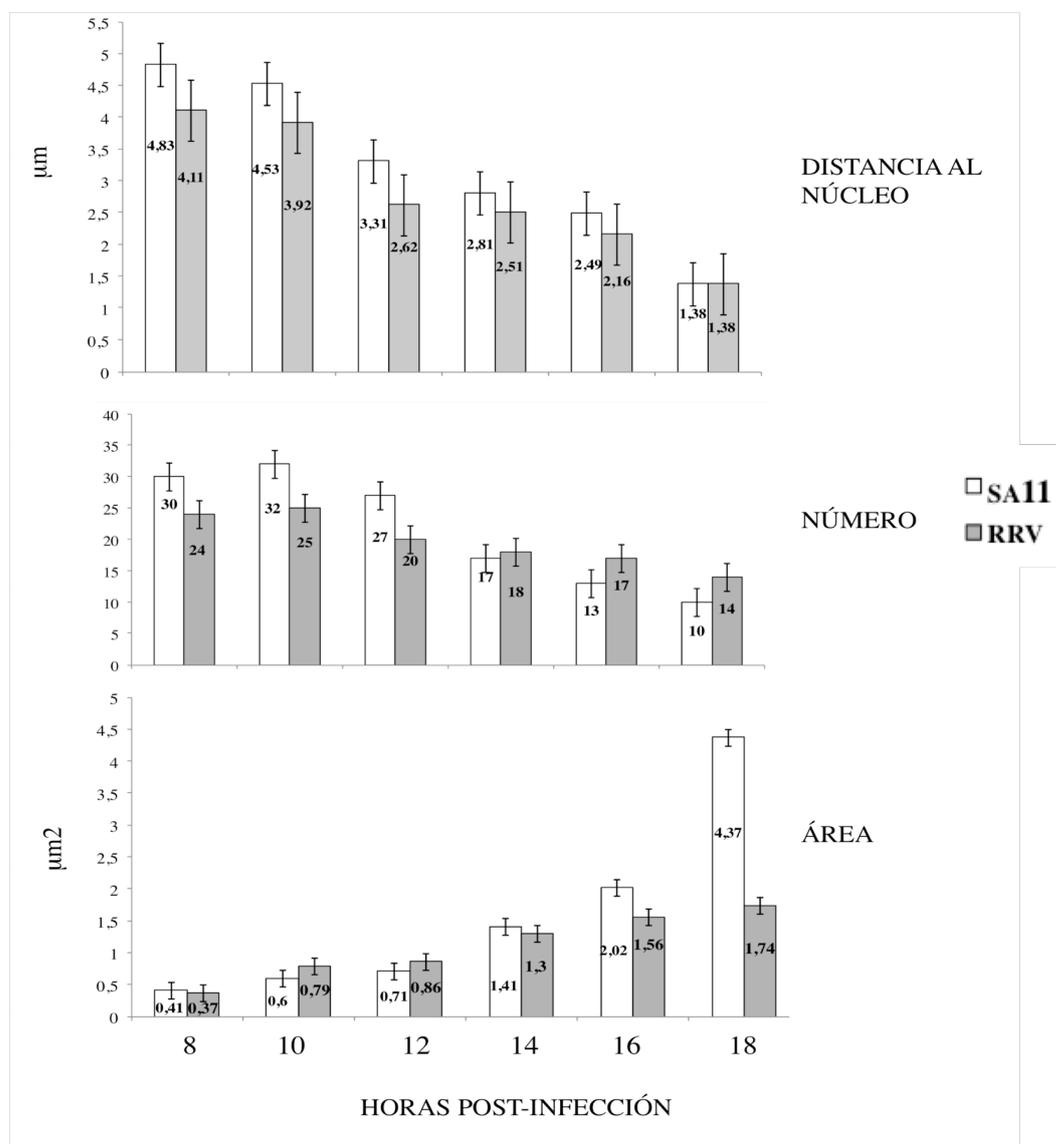
### 6.1 DIFERENCIAS EN LA FORMACIÓN DE VIROPLASMAS ENTRE LAS CEPAS SA11 Y RRV.

Trabajos previos han descrito la cinética de formación de viroplasmias en células MA104 infectadas con SA11, encontrando que aumentan de tamaño y disminuyen en número con el tiempo post-infección (Eichwald, *et al.* 2004). Para determinar si es un efecto de rotavirus en general ó de la cepa SA11 en particular, células BSC1 fueron infectadas con la cepa SA11 ó RRV durante 18 hpi con intervalos de 2 h, para comparar la cinética de formación de viroplasmias de ambas cepas de los 8 a 18 hpi (Figura 7). Nuestros resultados muestran que los viroplasmias producidos por ambas cepas aumentan en área y disminuyen en número, como lo describió Eichwald, sugiriendo que los viroplasmias son capaces de fusionarse a lo largo de la infección (Gráfica 1). Sin embargo, los viroplasmias de la cepa SA11 tiene una mayor capacidad de fusionarse ya que se refleja una reducción del 66.6% en el número de viroplasmias y un incremento de más de 10 veces el área promedio inicial a las 18 hpi; en cambio la cepa RRV solo se reduce en 41.6 % el número de viroplasmias con un incremento de 4 veces con respecto al promedio inicial. Además de los criterios de número y tamaño, en este estudio, también se determinó la distancia al núcleo ya que es un fenomeno que se había detectado cualitativamente en estudios realizados en nuestro laboratorio, pero no había sido

confirmado cuantitativamente. Así observamos en el transcurso de la infección que los viroplasma de SA11, reducen su distancia promedio de 4.83  $\mu\text{m}$  a las 8 hpi a solamente 1.38  $\mu\text{m}$  a las 18 hpi, midiendo la distancia a partir del centro del viroplasma a la periferia del núcleo celular (Figura 7 y Gráfica 1). La cepa RRV mostró un fenotipo similar al de SA11; los viroplasma se desplazaron hacia el núcleo conforme transcurría la infección, de una distancia promedio de 4.11  $\mu\text{m}$  a las 8 hpi a una distancia promedio de 1.38  $\mu\text{m}$  a las 18 hpi (Figura 7 y Gráfica 1).



**FIGURA 7.** Cinética de crecimiento y migración de viroplasmos de las 8 a 18 hpi con intervalos de 2 h de las cepas SA11 (rojo) y RRV (verde). Se utilizó anticuerpo anti-NSP2 para detectar viroplasmos y DAPI para el núcleo. La barra indica 10 micras de longitud, a una magnificación de 60X.

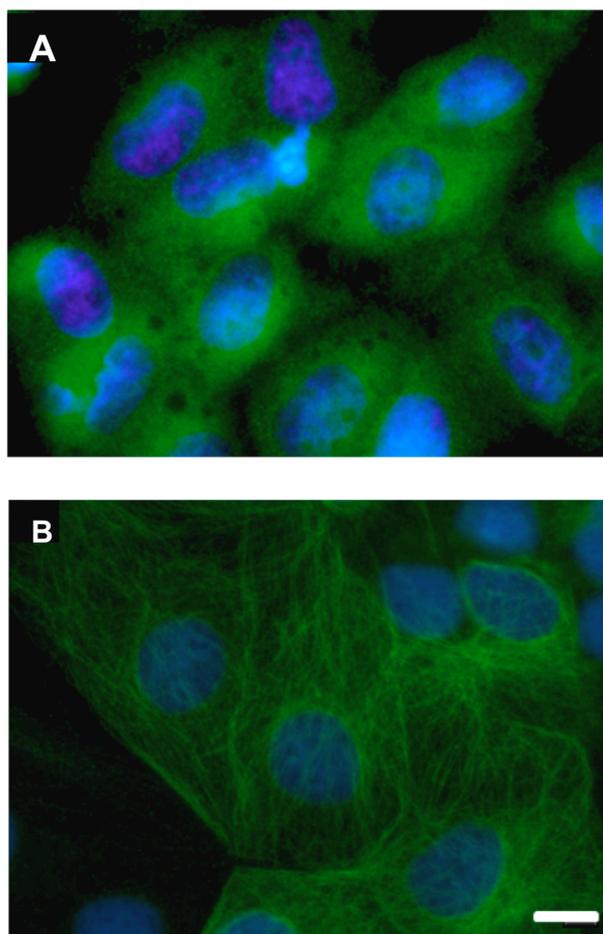


**GRÁFICA 1.** Cinética de crecimiento y migración de viroplasmias de las 8 a 18 hpi con intervalos de 2 h de las cepas SA11 y RRV. En las gráficas se indica el promedio de las mediciones hechas con una  $n=30$  (se cuantificaron los viroplasmias de 10 células infectadas de tres distintos ensayos); las barras indican desviación estandar (*std desv*) en área = 0.13; *std desv* en número = 1.22; *std desv* en distancia al núcleo = 0.48,  $p < .001$ .

## **6.2 VALIDACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE DOSIS UTILIZADAS DE NOCODAZOL Y TAXOL SOBRE MTs.**

### **6.2.1 VALIDACIÓN DEL EFECTO DE NOCODAZOL SOBRE MTs.**

Como se mencionó anteriormente en el laboratorio Cabral-Romero utilizó el nocodazol en células infectadas con SA11 y determinó su efecto cualitativamente sobre el crecimiento de viroplasmos utilizando una dosis de 15 µg/ml de nocodazol durante la infección. Nosotros utilizamos la misma dosis y validamos su efecto sobre MTs. En la figura 8A, se muestra células BSC1 tratadas con nocodazol, donde se aprecia claramente la despolimerización de MTs, presentando una apariencia difusa de los MTs en el citoplasma de la célula, comparado con la distribución normal de estos (B).

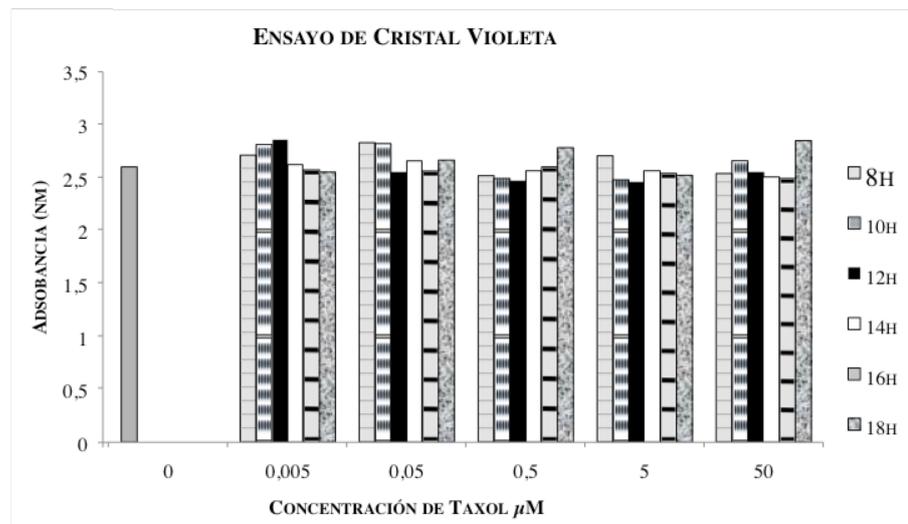


**FIGURA 8.** Alteración de MTs en células BSC1 no infectadas tratadas con y sin nocodazol. **A**, MTs de células tratadas por 18 h con 15  $\mu\text{g/ml}$  de nocodazol; **B**, MTs de células sin tratar. La barra indica 10 micras de longitud, a una magnificación de 60X.

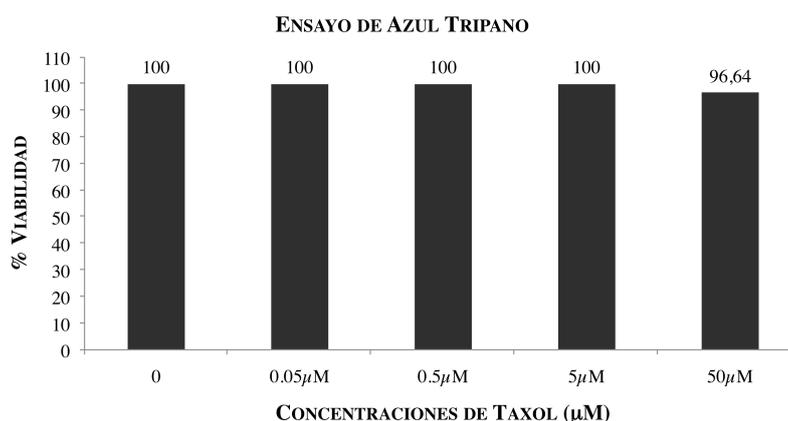
## 6.2.2 DETERMINACION DE DOSIS DE TAXOL A UTILIZAR.

### 6.2.2.1 VIABILIDAD CELULAR

Inicialmente determinamos la concentración de taxol a utilizar, empleamos intervalos de concentraciones de 0.005  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  y midiendo la viabilidad en células sin infectar, por tinción con cristal violeta que solamente se incorpora en células vivas. También, se determinó la viabilidad ante el tratamiento con 0.05  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  de taxol por tinción con azul de tripano, que es excluido de células vivas. Se encontró con ambos métodos que taxol no afectó la viabilidad en el intervalo de concentraciones utilizadas en éste estudio (Gráfica 2 y 3).



**GRÁFICA 2** . Efecto de taxol sobre la viabilidad de células BSC1 por el ensayo de cristal violeta. Células BSC1 fueron tratadas con taxol a concentraciones de 0.005  $\mu\text{M}$ , 0.05  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  durante distintos intervalos de tiempo de 8 a 18 h a 37°C.



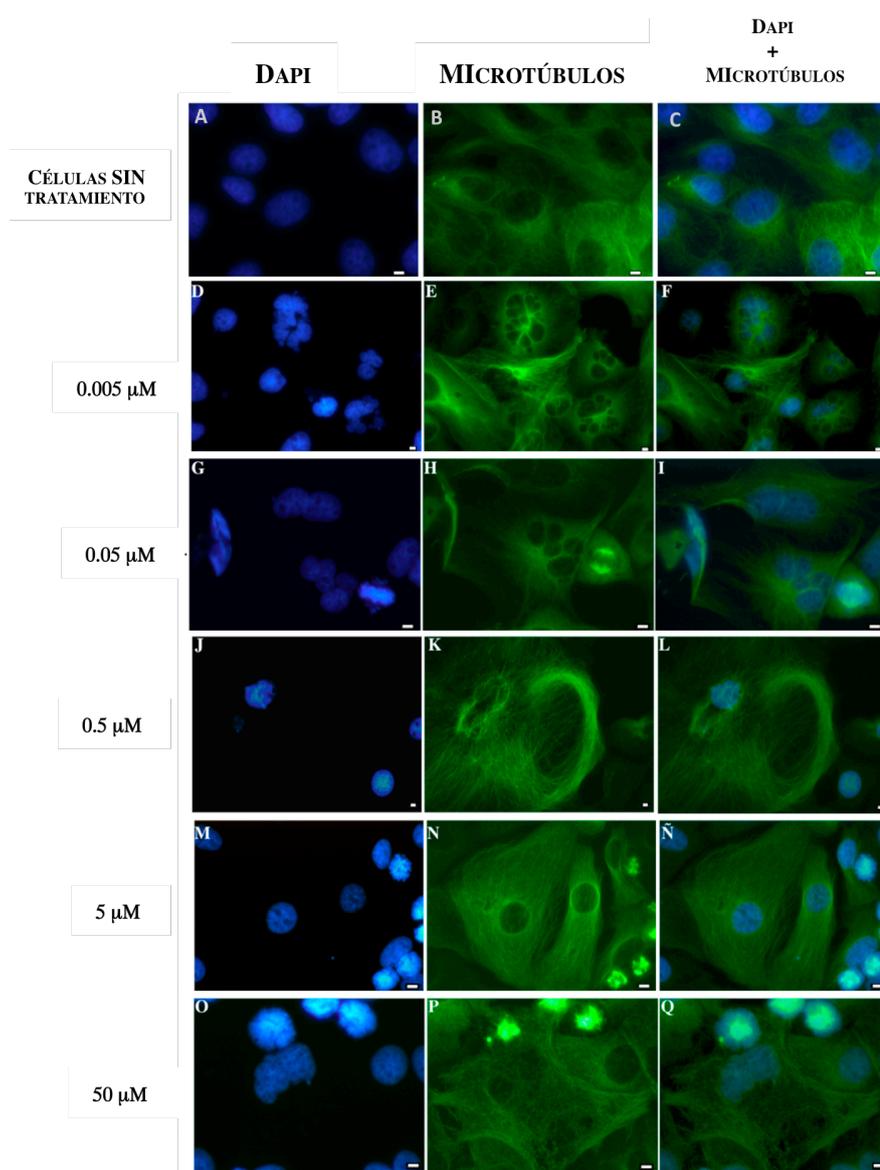
**GRÁFICA 3.** Efecto de taxol sobre la viabilidad de células BSC1 por el ensayo de azul tripano. Células BSC1 fueron tratadas con taxol a concentraciones de 0.05 mM, 0.5 mM, 5 mM y 50 mM por 18 h.

#### **6.2.2.2 EFECTO DE TAXOL SOBRE MTs.**

Una vez que se determinó que el taxol no afecta la viabilidad celular, se determinó el efecto de las concentraciones de 0.05  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  durante 17 h sobre la morfología de MTs y viroplasmas en células BCS1 infectadas con el rotavirus SA11 y en células control no infectadas. En células BSC1 no infectadas y tratadas con taxol se observa la estabilización de los MTs y éstos presentan una tendencia a estar agrupados hacia un extremo de la célula (Figura 9 D-Q). Además se observa una abundante cantidad de estructuras similares a sincicios (células plurinucleadas), las cuales resultan de la fusión de varias células con reabsorción de membranas; sin embargo, la técnica utilizada en este ensayo no es específica para detectar sincicios. Estos resultados coinciden con anteriores reportes, donde



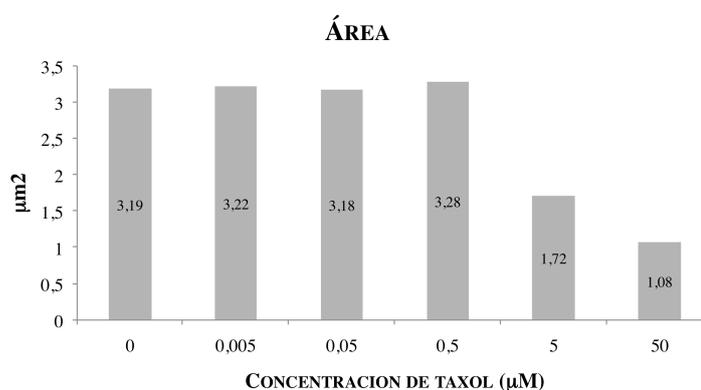
distintas concentraciones (3-10  $\mu\text{M}$ ) bloquean la mitosis entre los límites de metafase/anafase observando células con dos, tres o más núcleos; también reportan que podrían existir algunas células que pueden escapar del bloqueo mitótico y pueden convertirse en células anormales multinucleadas (Jordan, *et al.* 1993). A concentraciones de 0.5  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  se observaron estructuras aberrantes, como la formación de haces y crecimiento de tamaño del citoesqueleto (Figura 9 J-Ñ ). Finalmente a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  se observan un gran número de células que no pudieron dividirse, la separación del material genético se presenta en forma anormal, no hay formación del huso mitótico (Figura 9 O-Q).



**FIGURA 9.** Efecto de taxol sobre MTs en células BSC1 no infectadas. **A-C**, células sin tratamiento; **D-F**, células tratadas con taxol 0.005  $\mu$ M; **G-I**, células tratadas con taxol 0.05  $\mu$ M; **J-L**, células tratadas con taxol 0.5  $\mu$ M; **M-Ñ**, células tratadas con taxol 5  $\mu$ M; **O-Q**, células tratadas con taxol 50  $\mu$ M. La barra indica 10 micras de longitud a una magnificación de 60X, excepto para D-F y J-L con una magnificación de 40X.

### 6.2.2.3 DETERMINACION DE DOSIS DE TAXOL A UTILIZAR EN CÉLULAS INFECTADAS CON ROTAVIRUS.

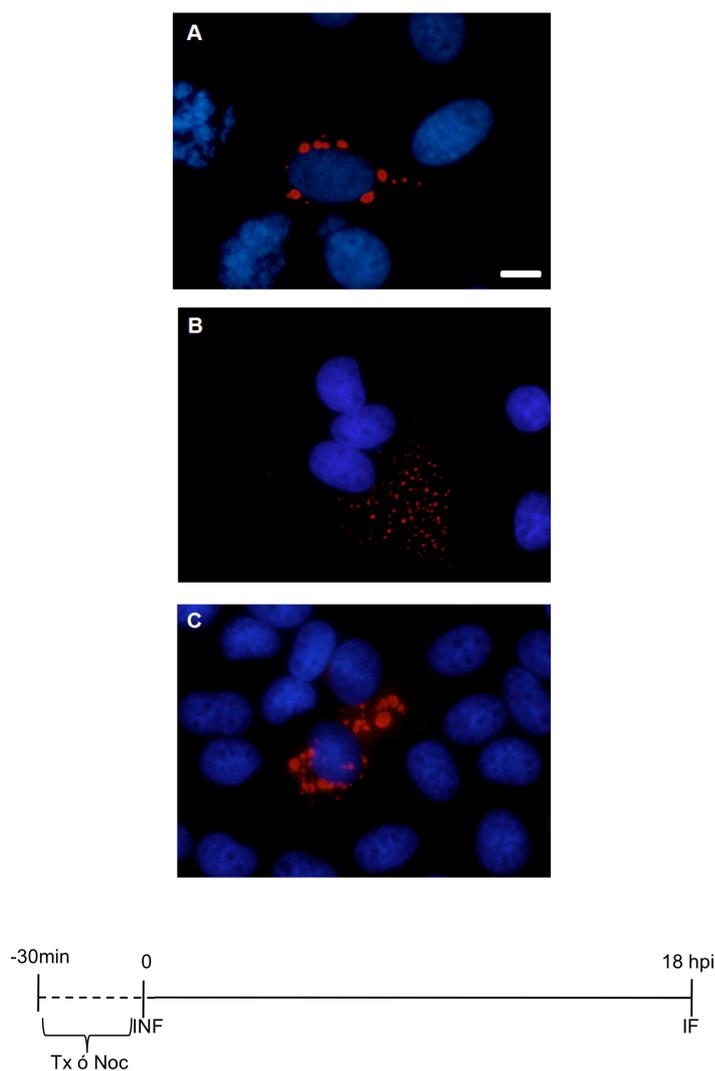
En células BSC1 infectadas con SA11 y tratadas con taxol se observó una disminución en el área y formación de estructuras aberrantes en las concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ ; y en las concentraciones de 0.005, 0.05 y 0.5  $\mu\text{M}$  aparentemente la morfología de viroplasmos no se observó alterada (Gráfica 4). Debido a lo anterior se decidió utilizar para ensayos subsecuentes la dosis de 0.05  $\mu\text{M}$  de taxol ya que la viabilidad celular fue del 100%, y no afectó la conformación de viroplasmos, y además la estabilización de MTs es evidente.



**GRÁFICA 4.** Efecto de taxol sobre el tamaño de los viroplasmos en células BSC1 infectadas con SA11. Células BSC1 infectadas con SA11 fueron tratadas con taxol 0.005, 0.05, 0.5, 5 y 50  $\mu\text{M}$  durante 17 h desde 1 hpi. Las barras indican el promedio de viroplasmos de diez células infectadas en un ensayo.

### **6.3 EL TRATAMIENTO CON TAXOL O NOCODAZOL PREVIO A LA INFECCIÓN NO AFECTA EL SEMBRADO DE VIROPLASMAS PERO SI SU LOCALIZACIÓN.**

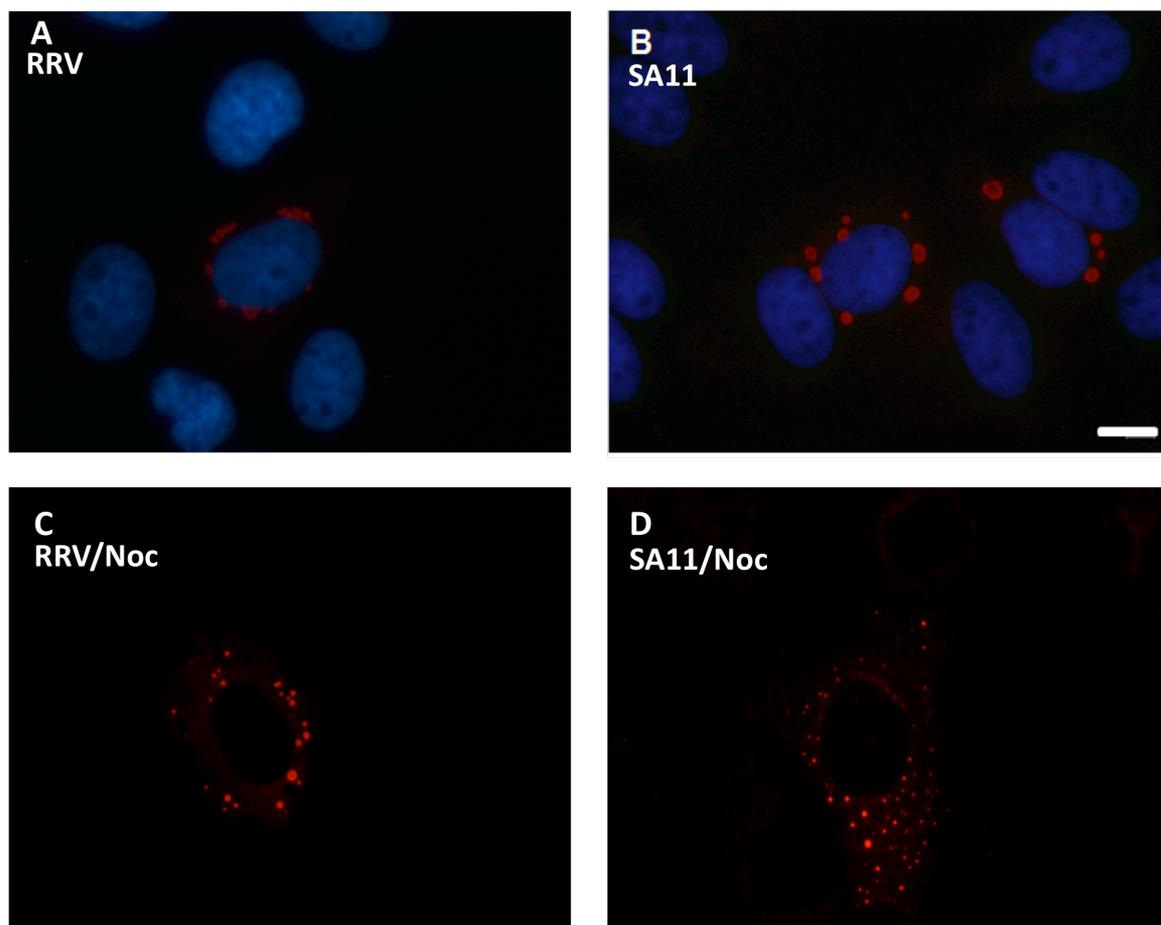
Se determinó si los viroplasmos son capaces de sembrarse (formarse) cuando previamente a la infección con SA11 los MTs se estabilizan por tratamiento con taxol o se despolimerizan por tratamiento con nocodazol. Para ello se trataron células BSC1 con 0.05  $\mu$ M de taxol ó 15  $\mu$ g/ml de nocodazol 30 minutos antes de la infección, se infectó y se dejó proceder la infección 18 h con las drogas presentes todo el tiempo a lo largo de la infección. Los viroplasmos fueron capaces de sembrarse aún cuando se afectó la dinámica de formación de MTs con taxol o nocodazol (Figura 10).



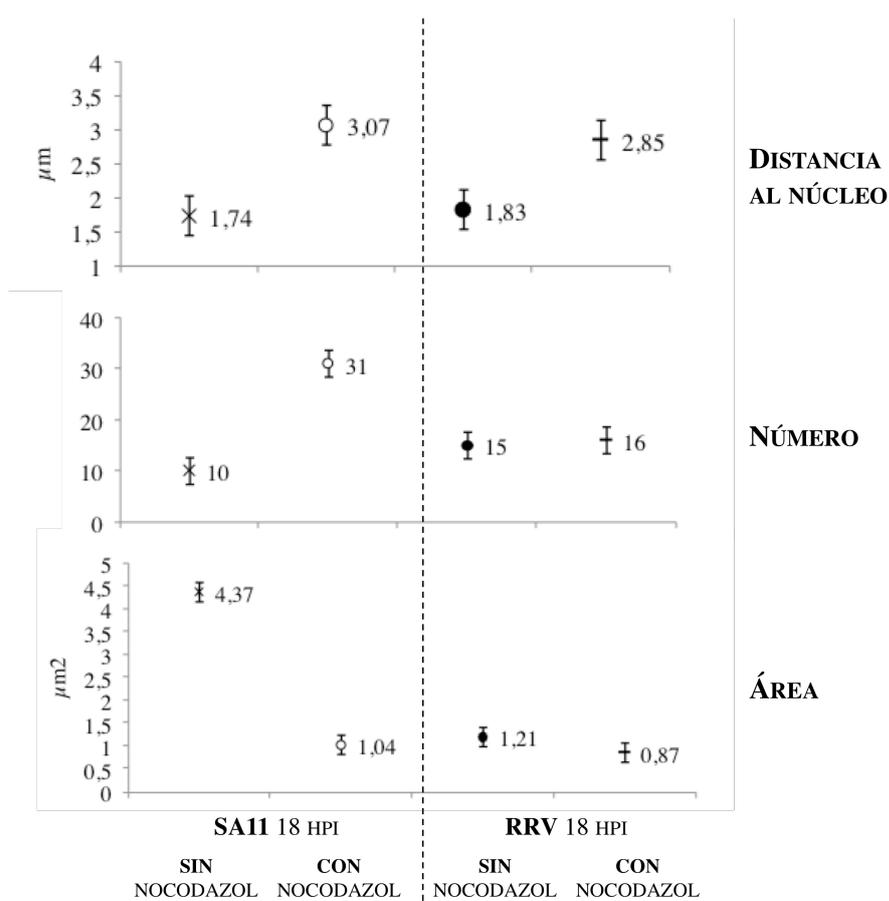
**FIGURA 10.** Efecto de tratamiento con taxol ó nocodazol adicionados previamente a la infección con rotavirus cepa SA11 sobre el sembrado de viroplasmata. Células BSC1 fueron tratadas 30 min antes de la infección con taxol 0.05  $\mu$ M o nocodazol 15  $\mu$ g/ml, manteniendo las drogas a lo largo de la infección hasta las 18 hpi. **A**, viroplasmata sin tratamiento; **B**, viroplasmata en células tratadas con nocodazol; **C**, Viroplasmata en células tratadas con taxol. La barra indica 10 micras, a una magnificación de 60X. **TX**= taxol, **NOC**= nocodazol, **INF**= infección, **IF**= inmunofluorescencia.

#### **6.4 EFECTO DE LA DESESTABILIZACIÓN DE MTs CON NOCODAZOL EN EL CRECIMIENTO DE VIROPLASMAS EN CÉLULAS INFECTADAS CON SA11 Ó RRV.**

Para determinar si el efecto de la desestabilización de MTs sobre la fusión y migración de viroplasmos es específico para la cepa SA11 o es un fenómeno más general, se evaluó la cinética de formación en células infectadas con la cepa RRV. El nocodazol aparentemente bloqueó completamente la fusión de viroplasmos determinados en células infectadas con SA11 a las 18 hpi ya que el número de viroplasmos presentes es muy similar al que se determinó en la fase inicial de su formación a las 8 hpi; mientras que el tamaño disminuyó 4 veces con respecto a las células no tratadas a las 18h post-infección (Figura 7 y Gráfica 1). En cambio en células tratadas e infectadas con RRV no hay efecto aparentemente en el número y tamaño; lo que podría indicar un mecanismo distinto de cepa SA11 de fusión de viroplasmos para la cepa RRV independiente de MTs. Sin embargo, en ambas cepas se altera claramente la migración a la región peri-nuclear (Figura 11 y Gráfica 5).



**FIGURA 11.** Efecto de nocodazol sobre viroplasmos de las cepas SA11 y RRV. Células BSC1 fueron infectadas con rotavirus SA11 y RRV y tratadas con nocodazol 15  $\mu\text{g/ml}$  manteniendo las drogas a lo largo de la infección hasta las 18 hpi. **A**, viroplasmos de la cepa RRV sin tratamiento; **B**, viroplasmos de la cepa SA11 sin tratamiento; **C**, Viroplasmos de la cepa RRV tratadas con nocodazol; **D**, Viroplasmos de la cepa SA11 tratadas con nocodazol; La barra indica 10 micras, a una magnificación de 60X..

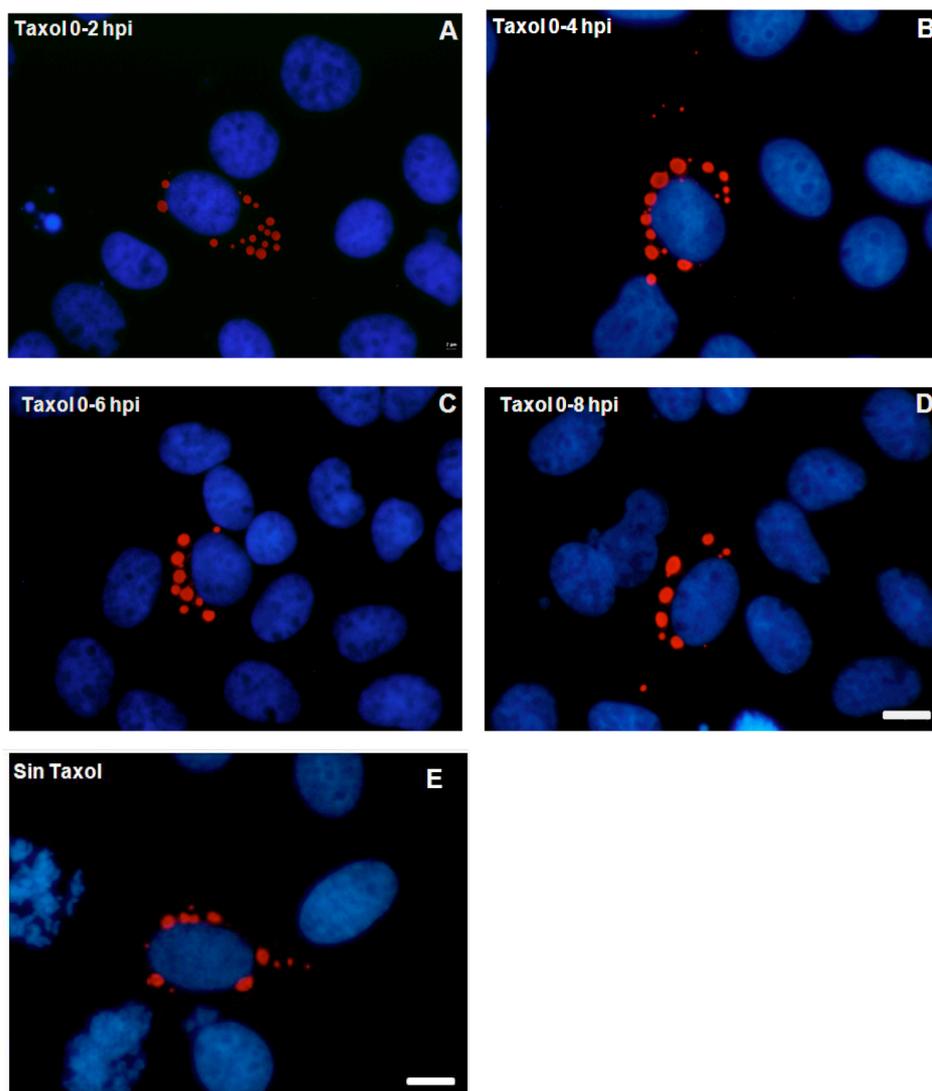


**GRÁFICA 5.** Efecto de nocodazol sobre viroplasmias en células BSC1 infectadas con las cepas SA11 ó RRV. Se realizaron distintas mediciones del área, número y distancia al núcleo de viroplasmias en células BSC1 infectadas con SA11 o RRV y tratadas o no con taxol 0.05 µM o nocodazol 15 µg/ml en el intervalo de 1 -18 hpi. En las gráficas se indica el promedio de las mediciones hechas con una  $n=30$  (se cuantificaron los viroplasmias de 10 células infectadas de tres distintos ensayos); las barras indican desviación estandar (*std desv*) en  $area= 0.21$ ; *std desv* en  $número=1$ ; *std desv* en  $distancia\ al\ núcleo=0.29$ ,  $p<.001$ .

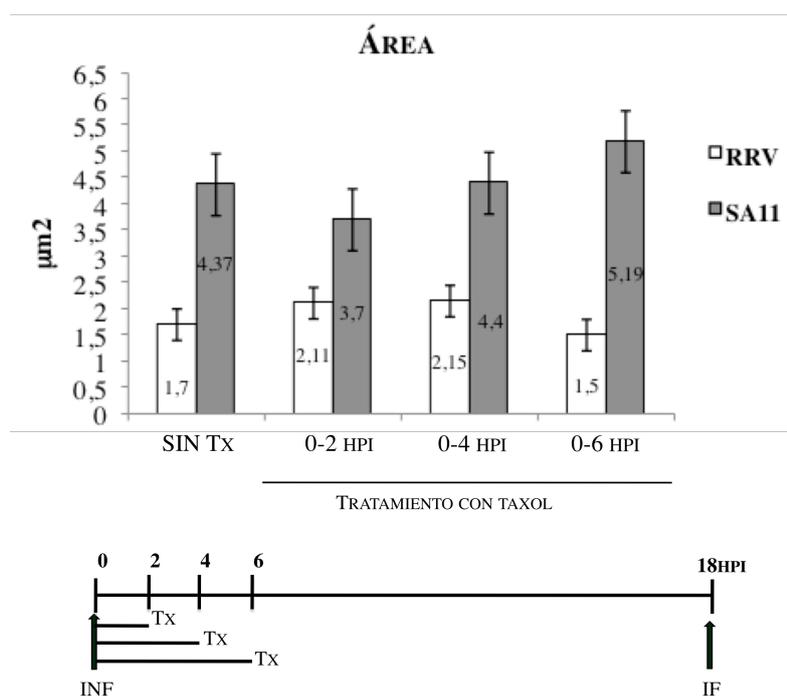
## **6.5 LA ESTABILIZACIÓN DE MTs CON TAXOL FAVORECE EL CRECIMIENTO DE VIROPLASMAS DE SA11.**

Debido que inicialmente hipotetizamos que la estabilización con taxol podría favorecer el crecimiento de viroplasmos, probamos el efecto de distintos intervalos de tiempo de tratamiento con taxol sobre el tamaño de viroplasmos en células BSC1 infectadas con SA11. Inicialmente probamos tratamientos largos en la fase tardía de la infección, en el intervalo de tiempo de 10 a 18 hpi, sin observar un efecto aparente (datos no mostrados), debido a lo anterior, como en nuestros datos de la cinética de formación de viroplasmos habíamos observado que entre las 2 a 8 hpi es donde ocurren los mayores eventos de fusión, decidimos realizar tratamientos en las etapas tempranas de la infección. Así que células BSC1 infectadas con la cepa SA11 fueron tratadas con taxol en el tiempo cero y posteriormente se hicieron lavados para retirar el tratamiento a las 2, 4, y 6 hpi, dejando la infección por 18 h y fijar entonces las células para simplificar la metodología.

En la Figura 12 se observa el efecto de los distintos intervalos de tratamiento a tiempos tempranos con taxol en células BSC1 infectadas con SA11. Los viroplasmos en células tratados con taxol durante las etapas tempranas son más grandes en comparación con los que no fueron tratados (Gráfica 6) alcanzando un tamaño máximo en el tratamiento de las 0 a 6 hpi de tratamiento con taxol. En cuanto el número y distancia al núcleo no hubo diferencias (datos no mostrados).



**FIGURA 12.** Efecto de tratamiento con taxol 0.05  $\mu$ M durante distintos intervalos de tiempo sobre el área de viroplasmos en células BSC1 infectadas con SA11. **A**, viroplasmos 0-2 hpi de tratamiento; **B**, viroplasmos 0-4 hpi de tratamiento; **C**, viroplasmos con 0-6 hpi de tratamiento y **D**, viroplasmos con 0-8 hpi de tratamiento; y **E**, viroplasmos sin tratamiento. Las células fueron fijadas a las 18 hpi y se procesaron para visualizar en rojo con anti-NSP2 y en azul el núcleo teñido con DAPI. La barra indica 10 micras de longitud, a una magnificación de 60X.

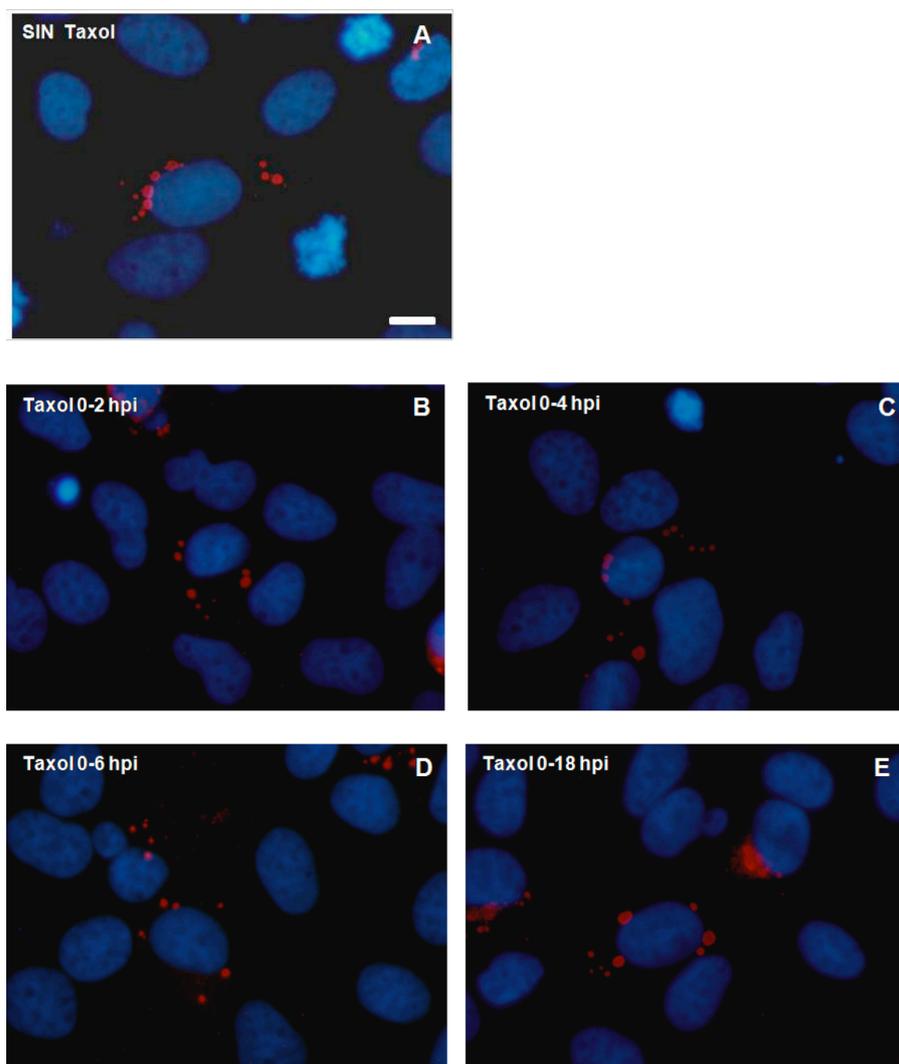


**GRÁFICA 6.** Efecto del tratamiento con taxol durante distintos intervalos de tiempo sobre el área de viroplasmata en células BSC1 infectadas con SA11. Células BSC1 infectadas con SA11 fueron tratadas con taxol 0.05  $\mu\text{M}$  de 0-2, 0-4, 0-6 o 0-8 hpi y fijadas a las 18 hpi. En las gráficas se indica el promedio de las mediciones hechas con una  $n=30$  (se cuantificaron los viroplasmata de 10 células infectadas de tres distintos ensayos); las barras indican desviación estandar (*std desv*) en  $\text{área} = 0,5$ ,  $P < .001$ .

## 6.6 LA ESTABILIZACIÓN DE MTs CON TAXOL AFECTA EL CRECIMIENTO DE VIROPLASMATA DE RRV.

Se determinó también el efecto de tratamiento durante distintos intervalos de tiempo con taxol sobre el área, número y distancia al núcleo de viroplasmata en células BSC1 infectadas con otra cepa de rotavirus RRV. En el caso de la cepa

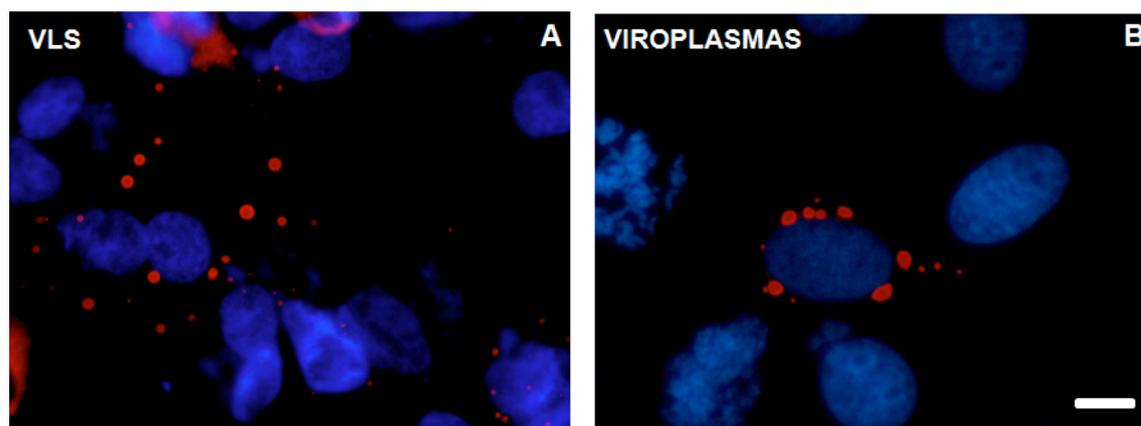
RRV el tratamiento con taxol tiene un efecto distinto al de la cepa SA11 (Gráfica 6), a las 6 hpi de tratamiento con taxol el tamaño de los viroplasma visualizados a las 18 hpi disminuye, situación contrario a la cepa SA11 donde con ese intervalo de tratamiento con taxol los viroplasma alcanzan su tamaño máximo (Gráfica 6), mientras que en células infectadas con RRV fueron necesarias 18 hpi de tratamiento continuo con taxol para que los viroplasma alcanzaran su máximo tamaño (Figura 13). En contraste, con los distintos intervalos de tratamiento con taxol y no hubo diferencias en el número y migración peri-nuclear de los viroplasma de RRV (datos no mostrados).



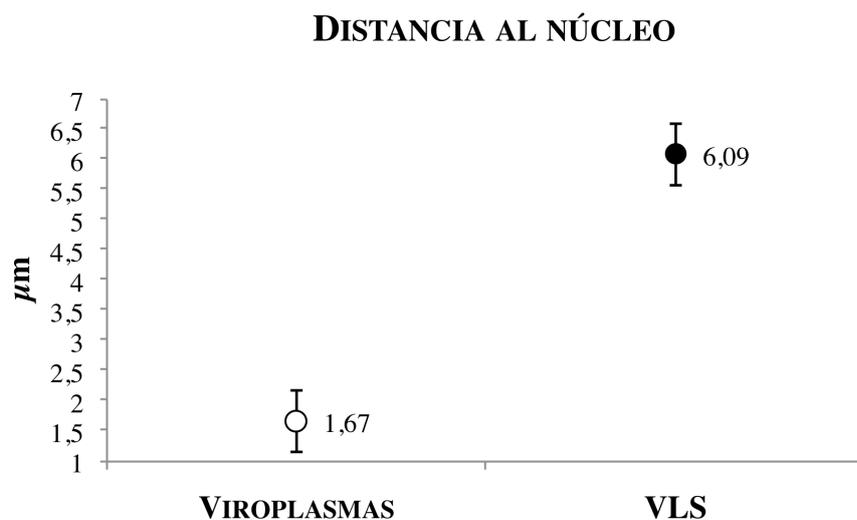
**FIGURA 13.** Efecto del tratamiento con taxol 0.05  $\mu$ M durante distintos intervalos de tiempo sobre el área de viroplasmias en células BSC1 infectadas con RRV. **A**, viroplasmias sin tratamiento; **B**, viroplasmias 0-2 hpi de tratamiento; **C**, viroplasmias 0-4 hpi de tratamiento; **D**, viroplasmias con 0-6 hpi de tratamiento y **E**, viroplasmias con 0-18 hpi de tratamiento. Las células se fijaron a las 18 hpi y en rojo viroplasmias utilizando anti-NSP2 y en azul el núcleo teñido con DAPI. La barra indica 10 micras de longitud, a una magnificación de 60X.

### **6.7 LOS VLS DE ROTAVIRUS NO MIGRAN A LA REGIÓN PERINUCLEAR.**

Aunque ya se sabe que al expresar a NSP2 y NSP5 mediante el sistema híbrido de vaccinia se forman VLS, no se ha caracterizado su ubicación en el citoplasma en relación al núcleo. Los VLS presentan un fenotipo diferente a los viroplasma, ya que se encuentran distribuidos a lo largo del citoplasma después de 18 h post-transfección, mientras que los viroplasma generalmente al final de la infección se encuentran rodeando la región peri-nuclear (Figura 14). En la Gráfica 7 se muestra la distancia de los VLS comparada a los viroplasma hacia la región peri-nuclear; lo que indica que otro componente viral distinto de NSP2 y NSP5 pudiera estar involucrado en la migración de viroplasma a la región perinuclear.



**FIGURA 14.** Ubicación intracelular de (VLS) de SA11 formados por la expresión de las proteínas NSP2 y NSP5 en células BSC1 usando el sistema híbrido de vaccinia a las 18 h post-transfección y comparación con viroplasmos en células BSC1 infectadas con SA11 a las 18 hpi. **A**, VLS utilizando anti-NSP2; **B**, viroplasmos utilizando anti-NSP2. La barra indica 10 micras, a una magnificación de 60X.

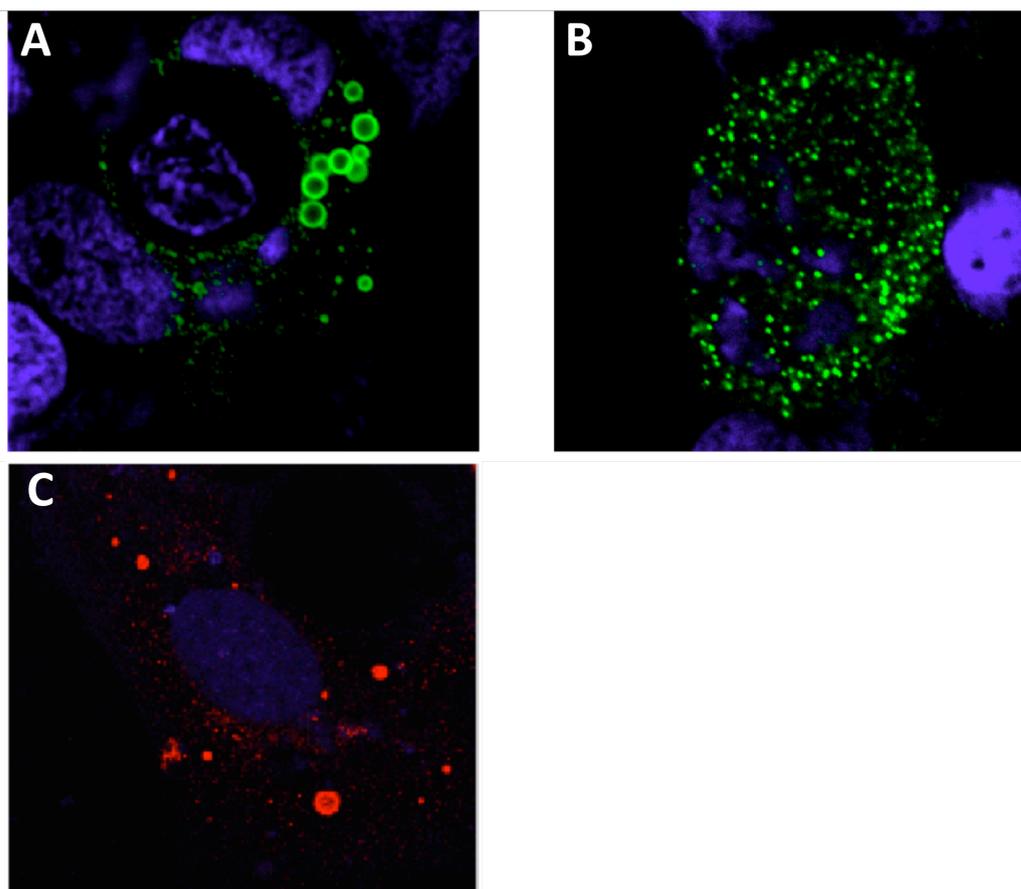


**GRÁFICA 7.** Diferencias de migración al núcleo entre viroplasmata en células BSC1 infectadas con SA11 a las 18 hpi y VLS formados por co-expresión de NSP2 y NSP5 a las 17 h post-transfección. En las gráficas se indica el promedio de las mediciones hechas con una  $n=30$  (se cuantificaron los viroplasmata de 10 células infectadas de tres distintos ensayos); las barras indican desviación estandar (*std desv*) en distancia al núcleo=0.51,  $P<.001$ .

### **6.8 LA ALTERACIÓN DE MTs CON TAXOL O NOCODAZOL TAMBIEN AFECTA EL TAMAÑO DE VLS.**

Para determinar si los MTs junto con los dos principales componentes de viroplasmata (NSP2 y NSP5) están involucrados en la fusión de viroplasmata, decidimos determinar también el efecto de taxol y nocodazol sobre el tamaño de VLS. El efecto observado en los VLS tratados con taxol y nocodazol es aparentemente similar al obtenido cuando las células son infectadas con la

partícula de rotavirus, ya que en los VLS tratados con taxol presentan una tendencia de crecimiento, sin embargo también se observan VLS muy pequeños; mientras que los VLS tratados con nocodazol son tan pequeños que no pudieron cuantificarse en cuanto a tamaño (Figura 15). Estos datos sugieren que el fenómeno de fusión no depende de la replicación, en contraste a la migración que depende de otros factores virales.

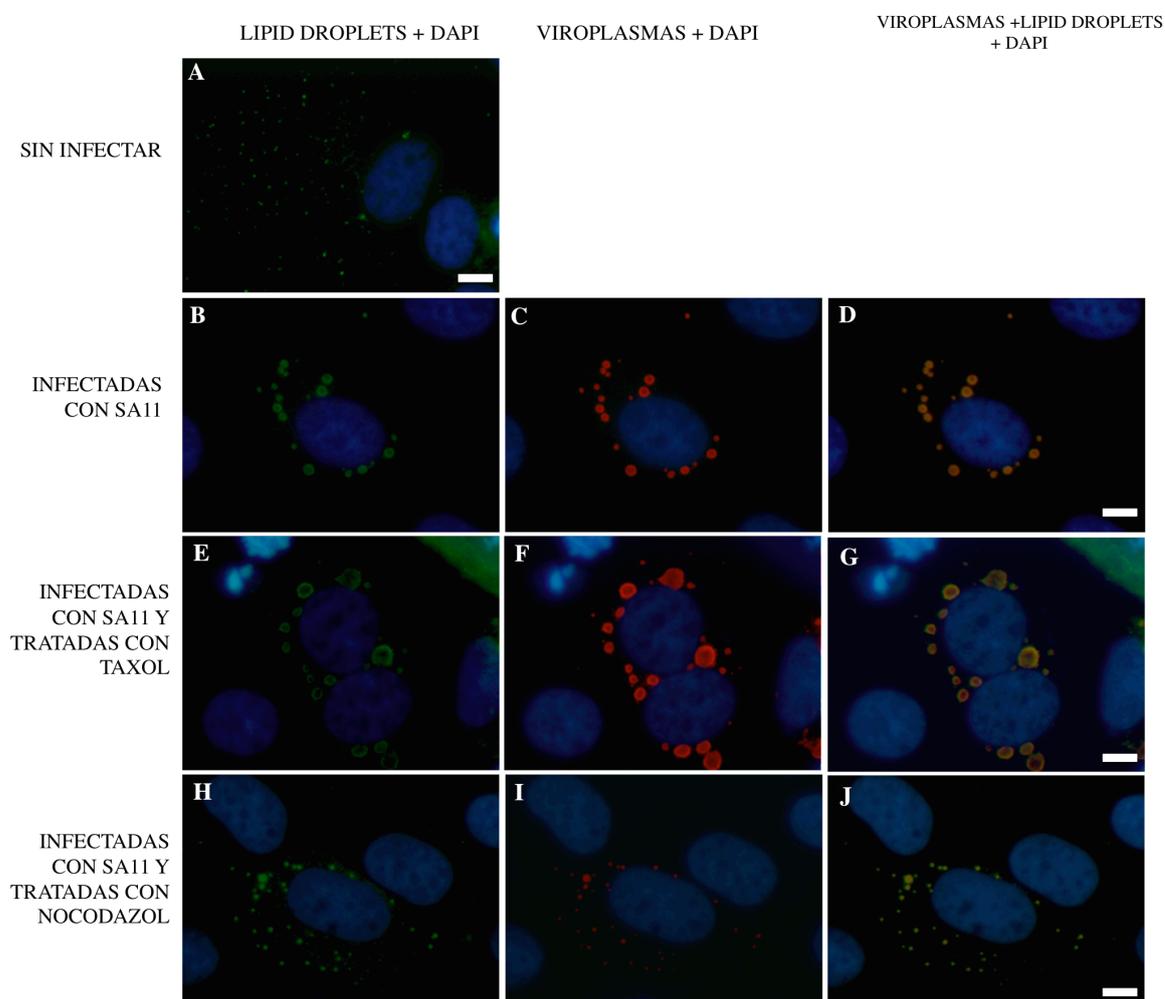


**FIGURA 15.** Efecto de taxol y nocodazol sobre VLS en células BSC1 en las que se expresa NSP2 y NSP5 a las 17 h post- transfección. **A**, VLS sin tratamiento (verde); **B**, VLS tratados con nocodazol 15 mg/ml por 18 hpi (verde) **C**, VLS tratados con taxol 0.05 mM (rojo). Microscopia confocal a una magnificación de 60X.

## **6.9 OTROS COMPONENTES CELULARES INVOLUCRADOS EN LA FORMACIÓN Y CRECIMIENTO DE VIROPLASMAS.**

### **6.9.1. LIPID DROPLETS**

Reportes recientes muestran la asociación de viroplasmos de SA11 con proteínas asociadas LD en células MA104, específicamente NSP2 y NSP5 se asocian con perilipina y adipofilina (Cheung, *et al.* 2010). En este estudio confirmamos la asociación de LD con viroplasmos. En células sin infectar los LD se observan como pequeños puntos distribuidos a lo largo del citoplasmas, a diferencia de las células infectadas con rotavirus donde se muestra claramente la co-localización de LD y viroplasmos principalmente en la periferia de viroplasmos (Figura 16). Así mismo observamos que al tratar las células con taxol por 18h, aparentemente los viroplasmos presentan un aumento de tamaño y con ellos los LD rodeándolos en la periferia (Figura 16 E-G), obteniendo el efecto contrario con nocodazol, donde los viroplasmos se observan de menor tamaño distribuidos en el citoplasmas (Figura 16 H-J). En los tres casos donde se observan células infectadas con SA11, con y sin tratamiento con taxol ó nocodazol, los LD siempre se encuentran rodeando los viroplasmos como si la infección por rotavirus secuestrara los LD alrededor de los viroplasmos (Figura 16 B-J).



**FIGURA 16.** Asociación de LD con viroplasmos. Células BSC1 infectadas con rotavirus SA11 por 18 h con y sin tratamiento con taxol 0.05  $\mu$ M ó nocodazol 15  $\mu$ g/ml. **A**, células BSC1 sin infectar; **B-D**, células BSC1 infectadas con rotavirus SA11 por 18h; **E-G**, células BSC1 infectadas con rotavirus SA11 y tratadas con taxol por 18h; **H-I**, células BSC1 infectadas con rotavirus SA11 y tratadas con nocodazol por 18h. En verde se observan los LD, el rojo NSP2 y en azul el núcleo de la célula. La barra indica 10 micras, a una magnificación de 60X.

## 7. DISCUSIÓN

La formación de viroplasma se considera el evento más evidente del conjunto de eventos celulares que caracteriza a la replicación de rotavirus. Previamente a este estudio se sabía que a tiempos tempranos los viroplasma son generalmente pequeños y distribuidos en todo el citoplasma, mientras que a tiempos tardíos de la infección los viroplasma aumentan en área y disminuyen en número (Eichwald, *et al.* 2004). Sin embargo no se había reportado la migración de viroplasma a la región perinuclear. El hecho de que tanto la migración al núcleo como el crecimiento de estos ocurre gradualmente, y que las drogas taxol y nocodazol afectan positiva o negativamente ambos fenotipos, el tamaño y la distancia a núcleo. Estos resultados indican que el crecimiento y la migración de viroplasma son distintas manifestaciones del mismo proceso; el crecimiento particularmente está dado por la fusión y otros factores específicos de cada cepa.

En este estudio observamos que el tamaño de los viroplasma en células BSC1 infectados con el rotavirus SA11 son mayores que los de células infectadas con RRV. Sin embargo la dinámica de formación de viroplasma tanto de SA11 como de RRV son iguales a las reportadas anteriormente por Eichwald en el 2004 con NSP2-EGFP en células MA104, donde los viroplasma van aumentando de tamaño disminuyen en número a lo largo de la infección. Así mismo, obtuvimos evidencia de que en ambas cepas ocurre la migración al núcleo. El hecho de que tanto en SA11 como en RRV ocurran los mismos procesos, el aumento de

tamaño por fusión, y de migración al núcleo de viroplasmos, pero con distinto resultado en cuanto a tamaño es explicable si la eficiencia de fusión de viroplasmos de SA11 es mayor que la de RRV.

La migración unidireccional y centrípeta de los viroplasmos al núcleo es similar a lo que se observa en algunos organelos celulares como los endosomas. Los endosomas tempranos se mueven a través de los MTs a la región perinuclear donde son convertidos en endosomas de fase tardía, finalmente éstos se fusionan con lisosomas donde las partículas que fueron endocitadas son procesadas para su degradación (Loubéry, *et al.* 2008).

Anteriormente Cabral-Romero utilizó el nocodazol, una droga que despolimeriza los MTs, adicionado a distintos tiempos post-infección, sugiriendo que nocodazol no interfiere con eventos tempranos de formación de viroplasmos y sólo interfiere con su crecimiento. Con el fin de ampliar estos estudios diferenciando estrictamente sembrado de crecimiento, nosotros tratamos a las células 30 min previos con nocodazol o taxol a la infección para determinar si los viroplasmos son capaces de sembrarse a pesar de que los MTs estuvieran alterados. Los viroplasmos lograron sembrarse o formarse a pesar de que los MTs estuvieran alterados, concluyendo que los MTs no son estrictamente necesarios para el sembrado de viroplasmos. Un experimento similar fue realizado recientemente por Martín D., tratando las células 1h antes de la infección, manteniendo el

tratamiento durante 6 hpi, obteniendo un resultado similar al nuestro.

Es posible que dímeros de tubulina o protofilamentos sean suficientes para el sembrado de viroplasma de la cepa SA11, ó como Martin propone, que los viroplasma de manera predominante se pueden formar en un MTOCs secundario durante la infección de rotavirus (Martín, *et al.* 2010). Sin embargo hay diferencias importantes entre nuestro estudio y el de Martin, ya que ellos concluyen que a pesar de que el nocodazol fue agregado antes y después de la infección, la distribución de los viroplasma no fue alterada, sugiriendo que los MTs no tienen un impacto en la localización de viroplasma, y que la red de MTs no es esencial en el ciclo viral de rotavirus (Martin, *et al.* 2010). Un punto importante a clarar es que en los experimentos de Martin, utilizaron tiempos cortos de infección de 6 hpi, y por ello no ven el claro efecto que produce la despolimerización de MTs a lo largo de 18 hpi. En nuestras observaciones de cinética de formación de entre 2 y 8 hpi los viroplasma generalmente son pequeños y distribuidos en todo el citoplasma (Figura 7), así que no importa si se deja el tratamiento durante las 6 hpi, no se ve un efecto del nocodazol, por que a ese tiempo los viroplasma no crecen ni migran significativamente. Así concluimos que los MTs si son importantes para la localización de viroplasma; y por ello proponemos dos etapas de formación de viroplasma, la primera es el “sembrado”, que es la asociación de NSP2 y NSP5 con dímeros de tubulina o protofilamentos que sirven de plataforma para una incorporación inicial de proteínas virales. Si estos

complejos se incorporan a MTs, entonces se establecería una fase de “crecimiento” donde los viroplasma migran hacia la región perinuclear y simultáneamente crecen por fusión, y por ello en este estudio se demostró que los MTs son necesarios para el movimiento intracelular de los viroplasma.

En los experimentos de Cabral-Romero donde se realizaron tratamientos con nocodazol a distintos post-infección se observa claramente el efecto de la despolimerización de MTs sobre la distribución de viroplasma de SA11, observando viroplasma de menor tamaño y en mayor número que en células sin tratar con nocodazol. Coincidente con las observaciones de Cabral-Romero, en nuestros experimentos el efecto más evidente de nocodazol fue sobre el tamaño de viroplasma de la cepa SA11, afectando en menor medida el tamaño de viroplasma de RRV e importantemente su migración a la región perinuclear. Debido a que el tamaño de los viroplasma de SA11 es considerablemente mayor que los de RRV es posible que la eficiencia de fusión sea mayor en células infectadas con SA11 y en estas condiciones el tratamiento con nocodazol afecta más a los viroplasma de SA11 que a los de RRV. Así es evidente que las diferencias fenotípicas entre ambas cepas son simplemente el grado de eficiencia de fusión pero no el mecanismo de crecimiento de los viroplasma ni en la dependencia de este proceso de la red de MTs.

Así mismo, al analizar el efecto de la estabilización de MTs con taxol sobre células BSC1 infectadas con las cepas SA11 ó RRV; determinamos que el mayor

efecto obtenido fue al agregar la droga en etapas tempranas de la infección ya que en los tratamiento en etapas tardías de 10 a 18 h no se observó un efecto sobre el crecimiento y migración de viroplasmias (datos no mostrados), se decidió tratar a las células en etapas tempranas de la infección ya que es donde se observa los mayores eventos de fusión, como se muestra en nuestros resultados de la cinética de viroplasmias. A pesar de que no se exploró de manera exhaustiva el efecto de taxol fijando las células a distintos tiempos, debido a una mayor complejidad en la metodología; se determinó que en los viroplasmias de SA11 se favoreció su crecimiento entre las 6 y 8 hpi de tratamiento con taxol y para viroplasmias de RRV a las 18h de tratamiento se alcanzó su máximo tamaño. Indicando un comportamiento distinto en el crecimiento de viroplasmias entre ambas cepas, pero dependiente de la red de MTs.

En las FV de reovirus se ha determinado que la proteína  $\mu$ NS de ARV presenta residuos de aminoácidos importantes para el tamaño y la morfogénesis de las FV, sugiriendo un dominio relacionado con el crecimiento de FV, mismo que no es identificado en  $\mu$ NS de MRV; sin embargo, existen otros residuos de aminoácidos distintos a los de la cepa ARV, que aparentemente afectan la morfología de  $\mu$ NS de MRV sugiriendo que las diferencias de tamaño de las FV de MRV no son influenciadas por interacciones entre dominios de la misma proteína, sino más bien se basa en la capacidad de interactuar con proteínas de citoesqueleto que ayudan a transportar a FV a lo largo de MTs hacia el MTOC.

En el caso de rotavirus se sabe que existen diferencias moleculares en la superficie del octámero de NSP2 entre al menos el grupo A y C de rotavirus y no es posible intercambiar proteínas de ambas cepas para formar viroplasmos, lo cual indica que existen restricciones de interacción entre proteínas de diferentes cepas (Taraporewala, *et al.* 2006), posiblemente también la asociación o interacción con componentes celulares sea distinta entre las cepas SA11 y RRV y por ello veamos diferencias en el crecimiento de viroplasmos de ambas cepas.

Así mismo, algunos autores sugieren que el crecimiento de los viroplasmos pudiera permitir una adicional retención de nuevos ARNs(+) producidos en los viroplasmos, un evento que podría mejorar la replicación y el ensamble de cores. Patton (2006) propone que el crecimiento de los viroplasmos podría ser regulados por dos factores: 1) el número de ARNs(+) que escapan de los viroplasmos y 2) por el número de DLPs transcripcionalmente activos presentes en estos cuerpos de inclusión. Así las diferencias funcionales en el tamaño de los viroplasmos de SA11 y RRV podrían depender de diferencias en la eficiencia de los viroplasmos de estas cepas para producir y retener RNAm virales.

En la formación de VLS mediante el sistema híbrido de vaccinia, observamos que los VLS no migran a la región perinuclear como los viroplasmos. Esto indica que alguna proteína diferente a NSP2 y NSP5 viral pudiera estar involucrada en la migración, ya que los VLS son formados al co-expresar a NSP2 y NSP5 en ausencia del resto de proteínas virales. Los viroplasmos son complejos

multiproteícos y existen antecedentes de que NSP4, considerada como integral de RE, se ubica en estructuras semi-circulares en forma de anillo con una cercana asociación a los viroplasmos (González, *et al.* 2000). Proponemos que el aspecto más relevante de la migración de los viroplasmos se relaciona con el tráfico de las partículas virales en formación hacia la localización intracelular que sea requerida, y no necesariamente se relaciona con la formación de las partículas infecciosas.

Probablemente VP4 pudiera tener un papel importante en la migración de componentes virales en células infectadas con rotavirus ya que algunos autores han determinado que VP4 se une a la membrana plasmática a través de la red de MTs (Nejmeddine, *et al.* 2000) y además VP4 puede interactuar con Rab5 y PRA1, dos proteínas asociadas con el sistema endosomal (Enounf, *et al.* 2003). Chwetzoff propone que durante la infección VP4 se encuentra asociado con el citoesqueleto, una vez que los DLPs geman al RE, éstos adquieren una capa lipídica transitoria. VP7 es reclutado para formar la capa externa de la partícula viral. En este modelo se propone que VP4 no es ensamblado en el interior del RE sino en el interior de balsas lipídicas. Datos recientes indican que algunos balsas lipídicas pueden formarse en la vecindad del RE, y ser transportadas como vesículas a la membrana citoplasmática. Probablemente proteínas asociadas a citoesqueleto pudieran estar regulando interacciones de VP4 con componentes de membrana (Chewetzoff, *et al.* 2006). Debido a la relevancia de estructuras membranosas en la génesis de las partículas virales como RE y los LD,

proponemos que el movimiento de los viroplasmos en el interior de la célula esta funcionalmente ligado al tráfico de vesículas.

Existen rutas de proteínas que migran a la membrana celular mediante la ruta de exocitosis. Después de la biosíntesis de proteínas en el RE rugoso, las proteínas entran al aparato de Golgi y posteriormente migran a la superficie celular a través de la red Trans-Golgi usando acarreadores vesiculares. Cada uno de estos pasos es controlado por componentes del citoesqueleto, especialmente MTs que están asociados del RE a Golgi y Golgi a la superficie celular (Chewetsoff, *et al.* 2006).

Así mismo, en este estudio encontramos diferencias en la migración a la zona perinuclear de los viroplasmos formados en células infectadas con rotavirus. Mientras que los VLS formados por la co-expresión de NSP2 y NSP5 no migran a la región perinuclear. Sin embargo, al tratar a los VLS con taxol y nocodazol observamos un efecto similar al visto en viroplasmos, el tratamiento con nocodazol inhibe el crecimiento de VLS y el taxol favorece su crecimiento; lo que indica que los VLS son un modelo adecuado que refleja las propiedades de crecimiento de los viroplasmos pero no su migración.

Recientemente se estableció la asociación de LD y viroplasmos, sugiriendo que los LD sirven de plataforma para que NSP2 y NSP5 formen VLS y se asocien con complejos pre-cores (VP1, VP3, ARN+), VP2 y VP6. Aparentemente NSP2 y NSP5 son suficientes para reclutar componentes de LD específicamente perilipina. De manera paralela, actualmente otros autores proponen a NSP5 como una

proteína que orquesta el reclutamiento de las proteínas que forman los viroplasmos y su ensamble (Contin, *et al.* 2010). Sin embargo ninguno de los modelos, incluye a los MTs e incluso Contin descarta por completo una asociación de MTs con viroplasmos.

Cheung (2010) describe que al interferir la formación de los LD se observa una disminución en el número de viroplasmos, disminución en la replicación y disminución en la progenie viral, indicando la relevancia de LD en la replicación viral. Existen otros virus asociados a LD como el virus de la Hepatitis C (HCV) que afecta el metabolismo de lípidos en hospedero, lo cual induce una acumulación de LD en el hígado produciendo una esteatosis. Estudios recientes sugieren que LD juegan un paso crucial en el ciclo de HCV, y que proteínas de HCV, especialmente proteínas del core, son cruciales para la patogénesis y morfogénesis del virus (Fukasawa, 2010; Roingeard, *et al.* 2008). En el virus del dengue se ha determinado que los LD facilitan la replicación viral y sirven de plataforma para formación de la nucleocápside viral durante su encapsidación (Samsa, *et al.* 2009).

La dinámica de LD es compleja ya que además de estar involucrados en la homeostasis de lípidos, los LD interactúan con distintos organelos como los endosomas. Las proteínas Rab reclutan una gran variedad de proteínas efectoras que modulan la motilidad vesicular a sitios específicos en la membrana plasmática, por ejemplo Rab5 regula las interacciones con endosomas

tempranos, LD y su motilidad en MTs (Beller, *et al.* 2010; Murphy, *et al.* 2009).

En rotavirus ya se tenían antecedentes de la asociación de proteínas Rab5 y PRA1 con VP4 y principalmente Rab5 se asocia a LD, lo que refuerza el modelo propuesto por Chewetsoff, donde la liberación de las partículas virales están íntimamente ligadas al tráfico vesicular. Recientes reportes sugieren que la fusión de LD es dependiente de MTs, proteínas motoras como dineína y maquinaria de fusión SNARE y aparentemente su movimiento es esencial para su biogénesis (Walther, *et al.* 2009). Los LD son capaces de moverse rápido a través de los MTs, e interesantemente la habilidad de LD para formarse y crecer en tamaño es dependiente de proteínas motoras y MTs. Se sabe que anticuerpos neutralizantes de dineína reducen la formación de LD y la despolimerización de MTs con nocodazol inhibe la fusión de LD. Los LD que se encuentran en la célula no infectadas son de diferentes tamaños, que van de LD muy pequeños a muy grandes, sugiriendo que los LD pueden incrementar de tamaño después de ensamblarse, además los LD pueden incrementar de tamaño independientemente de la biosíntesis de triglicéridos (Zehmer, *et al.* 2009; Bostrom, *et al.* 2005).

Dada la complejidad de utilizar una u otra línea celular polarizada o no polarizada ó diferente cepa viral en el estudio de la replicación de rotavirus, nosotros proponemos un modelo de replicación en células de riñón de mono, es decir de origen extraintestinal, principalmente para la cepa SA11 (Figura 18), donde se asocian a los MTs con los viroplasmos. Integrando hallazgos obtenidos por

distintos grupos. Una de las vía más estudiadas es la vía de la endocitosis, (Arias, *et al.* 2010; López, *et al.* 2004) que produce una disminución en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de la vesícula endocítica promovida por una bomba de  $\text{H}^+$  tipo V, que induce la solubilización de las proteínas de la capa externa (VP7 y VP4) (Ruiz, *et al.* 2000; Chemello, *et al.* 2002). Posteriormente una serie de procesos (Benreau, *et al.* 2005; Crawford, *et al.* 2001; Ludert, *et al.* 1996; Charpinne, *et al.* 1997) ayudan a la permeabilización de la vesícula endosomal produciendo la liberación de la partícula de doble capa (DLPs) transcripcionalmente activa al citoplasma celular (Denisova, *et al.* 1999; Fields, *et al.* 2007). Una vez que los DLPs se encuentran en el citoplasma, se activa la transcripción asistida al menos por la ARN polimerasa VP1 y la proteína estructural VP2 que es co-factor de la polimerasa viral. Los ARNs recién sintetizados cumplen dos funciones: 1) como moldes para la síntesis de los ARNs complementarios para la replicación del genoma y 2) como ARN mensajeros que se dirigen a la traducción de proteínas virales. Así proponemos que inicialmente se forman dos complejos, uno de replicación formado por VP1,VP3 y VP2 y por otra parte se forma el complejo estructural compuesto por NSP5 y NSP2. NSP5 y NSP2 van a formar los VLS que van a servir de sembrado para los viroplasmias. El termino sembrado, se refiere a la asociación de NSP5 y NSP2 principalmente, con MTs; una vez sembrados los VLS, podrían reclutar a los LD (Cheung. *et al.*, 2010) y servir de plataforma para la incorporación del complejo de replicación (formado por VP1, VP2 y VP3 ). Ya

formados los viroplasma éstos promueven la replicación, empaquetamiento del genoma viral y ensamblaje de los DLPs. Los viroplasma a partir de las 2 a 3 horas después de la infección se encuentran distribuidos a lo largo del citoplasma, posteriormente con el transcurso de la infección, los viroplasma empiezan a migrar de manera centrípeta a la región perinuclear. Una vez formados los DLPs, abandonan el viroplasma y adquieren la capa externa al gemar a través de la membrana del RE y son liberadas a través de lisis celular (Fields, *et al.* 2007).

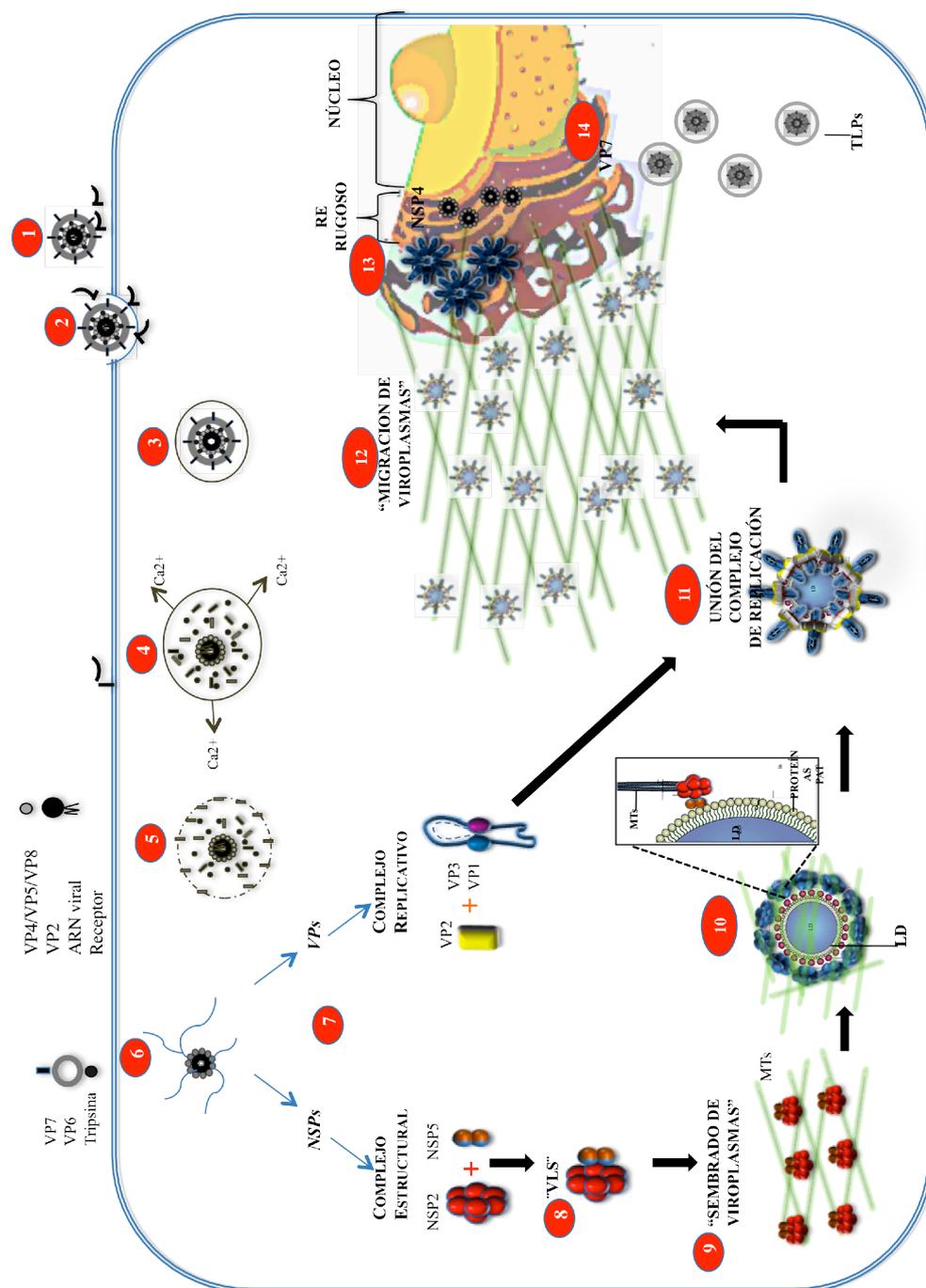


FIGURA 17 . Modelo del ciclo replicativo de rotavirus.

En conclusión en este trabajo se trata de enfatizar la importancia y el papel que juegan los MTs en la formación de viroplasmos y la relevancia de los MTs en la migración de los viroplasmos para la identificación de los mecanismos moleculares que determinan la morfogénesis de viroplasmos ayudando así entender la replicación viral.

## 8. CONCLUSIONES

1. Existen diferencias fenotípicas entre viroplasma de distintas cepas de rotavirus, los de RRV son más pequeños que los de SA11.
2. Los viroplasma migran a la región perinuclear en un proceso simultáneo a la fusión entre ellos.
3. Los MTs son estructuras esenciales para el crecimiento y migración de viroplasma.
4. Los MTs no son esenciales para el sembrado de viroplasma.
5. Es necesaria una red intacta de MTs para que viroplasma tanto de SA11 y RRV crezcan por fusión y migren a la región perinuclear .
6. La estabilización de MTs con taxol, favorece el crecimiento de viroplasma de SA11 y la migración de viroplasma de RRV a la región perinuclear.
7. El crecimiento de viroplasma por fusión es más eficiente en la cepa SA11 que la cepa RRV.
8. Los VLS formados por NSP2 y NSP5 no migran a la región perinuclear, sugiriendo que otros componentes son esenciales para la migración.
9. Rotavirus secuestran a LD alrededor de viroplasma durante la infección.

## **9. PERSPECTIVAS**

-Como perspectivas a futuro, un punto importante sería determinar el efecto de la estabilización y des-estabilización de MTs sobre la replicación viral.

-Determinar la naturaleza de las interacciones entre LD y NSP2 con MTs.

-Establecer de donde los viroplasmos toman la energía necesaria para poder migrar a la región perinuclear.

-Determinar el efecto de siRNA dirigido a dineinas y cinesinas sobre la replicación de rotavirus y cinética de viroplasmos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

Afrikanova I., Miozzo M.C., Giambiagi S. and Burrone O. (1996). Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. *J Gen Virol*, **77** (9): 2059-65.

Alberts B., Johson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P. (2002). *Molecular Biology of the Cell, 4th*. . New York. USA.: Garland Science (OPS), Publicación Científica y Técnica. 623 .

Amos L. A. (2010), Articulated tubes. *Structure*. **18** (8): 892-894.

Arias C. F., and López S. (2010). *Los rotavirus*. Departamento de Genética y Fisiología Molecular. Instituto de Biotecnología/UNAM. Av. Universidad Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, México.

Arnold M.M., Murray K.E., and Nibert M.L. (2008). Formation of the factory matrix is an important, though not a sufficient function of nonstructural protein  $\mu$ NS during reovirus infection. *Virology*, **375** (2): 412-423.

Arnoldi F., Campagna M., Eichwald C., Desselberger U., and Burrone O.R. (2007). Interaction of Rotavirus Polymerase VP1 with Nonstructural Protein NSP5 Is Stronger than That with NSP2. *J Virol*, **81** (5): 2128–2137.

Becker M.M., Peters T.R., and Dermody T.S. (2003). Reovirus  $\mu$ NS and  $\sigma$ NS proteins form cytoplasmic inclusion structures in the absence of viral infection. *J*

*Virology*: **77** (10), 5948-5963.

Beller M., Thiel K., Thul J.P., and Jäckle H. (2010). Lipid droplets: A dynamic organelle moves into focus. *FEBS Letters*. **584**: 2176-2182.

Benreau Y., Huet J.C., Charpilienne, A., Poncet, D., and Cohen, J. (2005). Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilización of outer capsid proteins. *J Gen Virol*, **86** (11): 3143-3151.

Berois M., Sapin C., Erk I., Poncet D., and Cohen J. 2003. Rotavirus Nonstructural Protein NSP5 Interacts with Major Core Protein VP2. *J Virol.*, **77**, (3):1757–1763.

Bostrom P., Rutberg M., Ericsson J., Holmdahl P., Andersson L., Frohman A.M., Borén J., and Olofsson O.S. (2005). Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, **25** (9): 1945–1951.

Brandariz-Nuñez A., Menaya-Vargas R., Benavente J., and Martinez-Costas J. Avian. (2010). Reovirus  $\mu$ NS Protein Forms Homo-Oligomeric Inclusions in a Microtubule Independent Fashion, Which Involves Specific Regions of Its C-Terminal Domain. *J Virol*, **84** (9): 4289–4301.

Broering T.J., Parker J.S., Joyce P.L., Kim J. and Nibert M.L. (2002). Mammalian reovirus Nonstructural Protein  $\mu$ NS Forms Large Inclusions and Colocalizes with

Reovirus Microtubules-associated protein  $\mu 2$  in transfected cells. *J Virol*, **76** (16): 8285-8297.

Broering T.J., Kim J., Miller C.L., Piggott C.D., Dinoso J.B., Nibert M.L. and Parker J.S. (2004). Reovirus Nonstructural Protein  $\mu$ NS Recruits Viral Core Surface Proteins and Entering Core Particles to Factory-Like Inclusions. *J Virol*, **78** ( 4 ): 1882–189.

Brunet J.P., Jourdan N., Cotte-Laffitte J., Linxe C., Niteau-Legendre M.G., Servin A. and Qué Ro A.M. (2000). Rotavirus Infection Induces Cytoskeleton Disorganization in Human Intestinal Epithelial Cells: Implication of an Increase in Intracellular Calcium Concentration. *J Virol*, **74** (22): 10801-10806.

Cabral-Romero C., and Padilla-Noriega L. (2006). Association of rotavirus viroplasmos with microtubules through NSP2 and NSP5. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **101** (6): 603-611.

Charpienne A., Abad J.M., Michelangeli F., Alvarado F., Vasseur M., Cohen J., and Ruiz M.C. (1997). Solubilized and cleaved VP7 the outer glycoprotein of rotavirus, induces permeabilization of cell membrane vesicles. *J Gral Virol*, **78**: 1367-1371.

Chemello M.E., Aristimuño O.C., Michelangeli F., and Ruiz M.C. (2002). Requirement for Vacuolar H-ATPase Activity and  $Ca^{2+}$  Gradient during Entry of

Rotavirus into MA104 Cells. *J Virol*, **76** (24): 13083–13087.

Cheung W., Gill M., Esposito A., Kaminski C., Courousse N., Chwetzoff S., Trugnan G., Keshavan N., Lever A., and Desselberger U. (2010). Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasm, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. *J Virol*, **84** (13): 6782–6798.

Chwetzoff S., and Trugnan G. (2006). Rotavirus Assembly: An Alternative Model That Utilizes an Atypical Trafficking Pathway. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, **309** :245–261.

Contin R., Arnoldi F., Campagna M., Burrone, O.R. (2010). Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. *J Gen Virol*. **91** (7):1782-93.

Crawford S.E., Mukherjee S.K., Estes M.K., Lawton J.A., Shaw A.L., Ramig R.F. and Prasad BV. (2001). Trypsin Cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J Virol*, **75** (13): 6052-6061.

Denisova E., Dowling W., Lamonica R., Shaw R., Scarlata S., Ruggeri F., and Mackow E.R. (1999). Rotavirus Capsid Protein VP5 Permeabilizes Membranes. *J Virol*, **73** (4): 3147–3153.

Derry W.B., Wilson L., Khan I.A., Luduena R.F. and Jordan M.A. (1997). Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from

unfractionated and purified b-tubulin isotypes. *Biochemistry*. **36**: 354-3562.

Eichwald C., Vascotto F., Fabbretti E. and Burrone O.R. (2002). Rotavirus NSP5: mapping phosphorylation sites and kinase activation and viroplasm localization domains. *J Virol*. **76** (7): 3461-70.

Eichwald C., Rodriguez J.F., and Burrone R. (2004). Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J Gen Virol*, **85**: 625- 634.

Elroy-Stein O., and Moss B. (1998). Gene Expression Using the Vaccinia Virus/T7 RNA Polymerase Hybrid System *Current Protocols in Molecular Biology* 16.19.1-16.19.11.

Enouf V., Chwetzoff S., Trugnan G, and Cohen J. (2003). Interactions of Rotavirus VP4 Spike Protein with the Endosomal Protein Rab5 and the Prenylated Rab *J Virol* **77** (12): 7041–7047.

Fabbretti E., Afrikanova I., Vascotto F. and Burrone O.R. (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol*, **80**: 333-339.

Fields B.N. Knipe D.M. and Howley P.M (2007). Cap 53 Rotavirus, *Fields Virology*, 5th ed., Vol. II.

Fukasawa M. (2010). Intracellular Lipid Droplet-Associated Proteins: Unique

Members and Their Biological Functions: Cellular Lipid Droplets and Hepatitis C Virus Life Cycle. *Biol. Pharm. Bull.* **33** (3): 355-359.

González R.A., Espinosa R., Romero P., López S, and Arias C.F. (2000). Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch Virol.* **145**(9):1963-73.

Jayaram H., Taraporewala Z, John T. Patton J.T. and Prasad B.V.V. (2002). Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold. *Nature.* **417**, 311-315.

Jiang X., Jayaram H., Kumar M., Ludtke S.J., Estes M.K., and Prasad B.V. (2006). Cryoelectron Microscopy Structures of Rotavirus NSP2-NSP5 and NSP2-RNA Complexes: Implications for Genome Replication. *J Virol*, **80** (21): 10829–10835.

Jordan M.A, Thrower D. and Wilson L. (1992). Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci.* **102** (3):401-16.

Jordan M.A., Toso R.J., Thrower D., and Wilson L. (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Cell Biol.* **90**: 9552-9556.

Kar A.K., Bhattacharya B. and Roy P. (2007). Bluetongue virus RNA binding protein NS2 is a modulator of viral replication and assembly. *BMC Mol Biol*, **8** (4): 1-13.

Kim Y., Chang K., Kim W., and Saif L. (2002). Production of hybrid double- or triple- layered virus-like particles of group A and C rotaviruses using a baculovirus expression system. *Virology*, **302**: 1-8.

Kumar M., Jayaram H., Vasquez-Del Carpio R., Jiang X., Taraporewala Z.F., Jacobson R.H., Patton J.T. and Prasad B.V. (2007). Crystallographic and Biochemical análisis of rotavirus NSP2 with Nucleotides reveals a Nucleoside Diphosphate Kinase- Like cativity. *J Virol*, **81** (22), 12272-12284.

López S., and Arias C.F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol*, **12** (6): 271- 278.

Loubéry S., Wilhelm C., Hurbain I., Neveu S., Louvard D., and Coudrier E. (2008). Different Microtubules Motors move early and late Endocytic compartments. *Traffic* , **9** (4): 492-509.

Ludert J.E., Krishnaney A.A., Burns J.W., Vo P.T., and Greenberg H.B. (1996). Cleavage of rotavirus VP4 in vivo. *J Gen Virol*, **77**: 391-395.

Martin D., Duarte M., Lepault J., and Poncet D. (2010). Sequestration of Free Tubulin Molecules by the Viral Protein NSP2 Induces Microtubule Depolymerization during Rotavirus Infection . *J Virol*, **84** (5): 2522-2532.

Mertens P. (2004). The dsRNA viruses. *Virus Res*, **101**(1): 3-13.

Miller C.L., Broering T.J., Parker J.S., Arnold M.M. and Nibert M.L. (2003). Reovirus NS Protein Localizes to Inclusions through an Association Requiring the NS Amino Terminus. *J Virol*, **77** (8): 4566–4576.

Miller C.L., Arnold M.M., Broering T.J., Hastings C.E. and Nibert M.L. (2010). Localization of Mammalian Orthoreovirus Proteins to Cytoplasmic Factory-Like Structures via Nonoverlapping Regions of  $\mu$ NS. *J Virol*, **84** (2): 867–882 .

Mitra A. and Sept D. (2008). Taxol allosterically alters the dynamics of the tubulin dimer and increases the flexibility of microtubules. *Biophys J*. **95**: 3252-3258.

Mossel E.C. and Robert F. Ramig R.F., (2003). A Lymphatic Mechanism of Rotavirus Extraintestinal Spread in the Neonatal Mouse. *J Virol*, **77** (22):12352–12356.

Murphy S., Martin S., and Parton G.R. (2009). Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochimica et Biophysica Acta* 1791: 441–447.

Nejmeddine M., Trugnan G., Sapin C., Kohli E., Svensson L., Lopez S., and Cohen J. (2000). Rotavirus Spike Protein VP4 Is Present at the Plasma Membrane and Is Associated with Microtubules in Infected Cells. *J Virol.* **74** (7): 3313–3320.

Parker J.S, Broering T.J., Kim J., Higgins D.E. and Nibert M.L. (2002). Reovirus Core Protein  $\mu$ 2 Determines the Filamentous Morphology of Viral Inclusion Bodies by Interacting with and Stabilizing Microtubules. *J Virol*, **76** (9): 4483-4496.

Parashar V.D., Hummelman E.G., Bresee J.S., Miller M.A., and Glass R.I. (2003). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 565-572.

Patton J.T., and Gallegos C.O. (2006). Rotavirus genome replication and morphogenesis: role of the viroplasm. Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, **309**: 169-187.

Petrie B.L., Graham D.Y., Hanssen H. and Estes M.K. (1982). Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocytochemistry. *J Gen Virol* , **63**: 457–467.

Petrie B.L., Greenberg H.B., Graham D.Y. and Estes M.K. (1984). Ultrastructural localisation of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Res*, **1**: 133–152.

Polard D.T. and Earnshaw C. W. (2008). *Cell Biology*. Second edition . Saunders Elsevier. Philadelphia, PA.. Chapter 43: 623-643.

Prasad B.V., Wang G.J., Clerx J.P. and Chiu W. (1988). Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol*, **199** (2): 269-275.

Ramig R., and Petrie B. (1984). Characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11: protein synthesis and morphogenesis. *J Virol*, **49**: 665–673.

Roingard P., and Hourieux C. (2008). Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *Journal of Viral Hepatitis* , **15**: 157–164.

Ruiz M.C, Cohen J. and Michelangelli F. (2000). Role of Ca<sup>2+</sup> in the replication and patogénesis of rotavirus and other viral infections. *Cell calcium* , **28** (3): 137-149.

Samsa M.M., Mondotte J.A , Nestor G. Iglesias N. G., and Assunção-Miranda I., Barbosa-

Lima G, Da Poian T. A., Bozza T. P, and Gamarnik V.A. (2009) Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. *PLoS Pathogens*. **5** (10): 1-14.

Schuck P., Taraporewala Z., McPhie P., and Patton T.J. (2001). Rotavirus Nonstructural Protein NSP2 Self-assembles into Octamers. *J Biol Chem*, **276** (13): 9679–9687.

Shannon K.B., Canman J.C., Moree C.B., Tirnauer J.S., and Salmon E.D. (2005). Taxol-stabilized Microtubules Can Position the Cytokinetic Furrow in Mammalian Cells. *Mol Biol Cell*, **16**: 4423– 4436.

Taraporewala Z.F. and Patton JT. (2001). Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2, *J. Virol.* **75** (10): 4519–4527.

Taraporewala Z.F, and Patton J.T. (2004). Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Res*, **101** (1): 57–66.

Taraporewala Z.F, Jiang X., Vasquez-Del Carpio R., Jayaram H., Prasad B.V. and Patton J.T. (2006). Structure-Function Analysis of Rotavirus NSP2 Octamer by Using a Novel Complementation System. *J Virol*, **80** (16): 7984–7994.

Taraporewala, Z.F.; Kumar, M.; Prasad, B.V.V. and Patton, T.J., (2008). Structure and function of the rotavirus NSP2 Octameran essential component of the viroplasm. Chapter 16. Caister Academic Press.

Vasquez-Del Carpio R., Gonzalez-Nilo F.D., Riadi G., Taraporewala Z.F. and Patton J.T. (2006). Histidine triad-like motif of the rotavirus NSP2 octamer mediates both RTPase and NTPase activities. *J Mol Biol*, **362** (3): 539-554.

Walther C. T., and Farese V. R. Jr. (2009). The life of lipid droplets. *Biochim Biophys*; **1791** (6): 459–466l.

Zehmer J.K., Huang Y., Peng G., Pu J., Anderson R.G., and Liu P. (2009). A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. *Proteomics*, **9** (4): 914–921.

Zeng C., Wentz M., Cohen J., Estes M., and Ramig R. (1996). Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants. *J Virol*, **70** (5): 2736–2742.