



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PAPEL DEL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LA REPLICACIÓN DE
ROTAVIRUS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA

QBP. Oscar Trejo Cerro

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Carlos Federico Arias Ortiz
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Federico Sánchez Rodríguez † (IBT-UNAM)
Dr. Ramón González García Conde (CIDC-UAEM)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Jurado

Presidente	Dra. Leonor Pérez Martínez
Secretario	Dr. Ernesto Ortiz Suri
Vocal	Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano
Vocal	Dr. Juan Ernesto Ludert León
Vocal	Dra. María del Carmen Beltrán Núñez

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del Dr. Carlos Federico Arias Ortiz. En la realización de la presente se contó con beca otorgada por CONACYT y el proyecto se desarrolló con apoyo económico del donativo CONACYT 221019, además de contar con el apoyo del PAEP para asistir al IX Congreso Nacional de Virología.

A mi madre, Joaquina, mi padre, Santos y mi hermano, Gustavo, gracias por todo su apoyo incondicional.

“La ciencia es como el sexo: algunas veces tiene aplicaciones prácticas, pero no es por eso que lo hacemos”

Richard Feynman

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	11
Generalidades de los rotavirus.....	11
Ciclo de replicación	12
Adsorción y penetración a la célula	12
Transcripción del genoma viral y traducción	13
Maduración y salida de la partícula viral.....	14
Citoesqueleto de actina	17
Polimerización y despolimerización del filamento de actina	17
Compuestos químicos que afectan la dinámica del citoesqueleto de actina	19
Proteínas de unión a actina.....	19
Sistema Rho-GTPasas	21
Mecanismos de señalización de las Rho-GTPasas.....	22
Regulación del citoesqueleto de actina por Rho-GTPasas	24
CDC42	24
Rac	24
Rho	25
Rol del citoesqueleto de actina en infecciones virales	27
Papel de la actina dentro del ciclo viral.....	28
ANTECEDENTES	30
Rotavirus modifica el citoesqueleto de actina	30
Interacciones entre proteínas virales y actina	30
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	33
General.....	33
Específicos	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
Células y virus.....	34
Anticuerpos y reactivos	34
Viabilidad celular	35
Tratamiento con inhibidores.....	35

Determinación del título viral	35
Inmunofluorescencia.....	36
Lipofección reversa de siRNAs	36
Western blot	36
Fraccionamiento celular por gradiente de densidad.	37
Biotinilación de proteínas de membrana.....	37
Preparación de balsas lipídicas	38
Microscopía Electrónica de Transmisión.....	38
RESULTADOS	40
Efecto de fármacos que alteran al citoesqueleto de actina en el rendimiento viral	40
Efecto del jasplakinólido sobre la organización del citoesqueleto de actina en células MA104 ..	43
Cinética de producción y liberación de virus	44
La infección con rotavirus no compromete la viabilidad celular a tiempos en los que inicia su salida de células infectadas.....	47
Parte de las partículas virales extracelulares se encuentran asociadas a estructuras lipídicas de baja densidad	48
Análisis por microscopía electrónica de células MA104 tratadas con jasplakinólido e infectadas con RRV	54
El jasplakinólido afecta la distribución intracelular de VP4	57
La asociación entre balsas lipídicas y rotavirus requiere del <i>treadmilling</i> del citoesqueleto de actina.....	62
La proteína VP4 presente en membrana plasmática se incorpora a partículas infecciosas.....	64
Caracterización del papel de proteínas reguladoras de la dinámica del citoesqueleto de actina en la replicación de rotavirus utilizando la interferencia de RNA.....	66
Efecto de los diferentes siRNAs que modifican al citoesqueleto de actina sobre diferentes etapas del ciclo replicativo de rotavirus	71
DISCUSIÓN.....	78
CONCLUSIONES	86
PERSPECTIVAS	87
REFERENCIAS.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes de reconstrucciones 3-D de las partículas de rotavirus.....	12
Figura 2. Ciclo replicativo de rotavirus.....	16
Figura 3. Dinámica de ensamblaje (<i>treadmilling</i>).....	18
Figura 4. Proteínas que participan en la organización del citoesqueleto de actina.....	21
Figura 5. Activación de las Rho-GTPasas.....	23
Figura 6. Señalización de Rac y CDC42 en la reorganización del citoesqueleto de actina.....	25
Figura 7. Señalización de Rho en la reorganización del citoesqueleto de actina.....	26
Figura 8. Diferentes rearrreglos del citoesqueleto de actina.....	27
Figura 9. Efecto de la citocalasina D, latrunculina B y jasplakinólido sobre la salida de RRV de células MA104.....	41
Figura 10. Efecto de la citocalasina D, latrunculina B y jasplakinólido sobre la producción total de virus.....	41
Figura 11. Jasplakinólido inhibe la salida de RRV en células MA104.....	42
Figura 12. Jasplakinólido no afecta la formación de partículas infecciosas de RRV.....	43
Figura 13. Efecto del jasplakinólido sobre células MA104 a diferentes tiempos.....	44
Figura 14. Cinética de liberación de la cepa RRV.....	45
Figura 15. Cinética de producción de virus infeccioso de la cepa RRV.....	46
Figura 16. La salida de rotavirus es inhibida por jasplakinólido.....	47
Figura 17. La salida de rotavirus de las células inicia cuando aún no se presenta daño celular.....	48
Figura 18. Rotavirus está asociado a estructuras de baja densidad en el sobrenadante celular.....	52
Figura 19. Partículas virales purificadas no flotan en el gradiente de densidad y el tratamiento de virus extracelular con detergente previene la flotación del virus.....	53
Figura 20. Imágenes de microscopía electrónica de virus extracelular asociado a estructuras membranosas de baja densidad.....	54
Figura 21. Microscopía electrónica de células MA104 infectadas con RRV en presencia o ausencia de jasplakinólido.....	57
Figura 22. Jasplakinólido afecta la localización de la proteína VP4 en el citoplasma.....	59

Figura 23. El jasplakinólido inhibe el transporte de VP4 hacia la membrana plasmática..	61
Figura 24. La asociación entre RRV y balsas lipídicas requiere del <i>treadmilling</i> del citoesqueleto de actina.....	64
Figura 25. La VP4 localizada en membrana plasmática es incorporada a partículas infecciosas.....	66
Figura 26. Rotavirus requiere de proteínas que reorganizan el citoesqueleto de actina..	67
Figura 27. Análisis de la eficiencia de los silenciamientos.....	68
Figura 28. El silenciamiento de Actn, Diaph y Rac1 no afecta la viabilidad celular.....	69
Figura 29. Efecto de los RNAi en la reorganización del citoesqueleto de actina.....	70
Figura 30. Las proteínas Diaph, Actn y Rac1 no intervienen en la salida de rotavirus de células infectadas.....	72
Figura 31. Actn y Diaph son requeridas para la entrada de rotavirus.....	73
Figura 32. La GTPasa Rac1 se requiere para la síntesis de proteínas de rotavirus.....	76
Figura 33. Rac1 afecta la síntesis de proteínas celulares.....	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Drogas que afectan al citoesqueleto de actina.....	19
--	----

RESUMEN

Rotavirus es el principal agente etiológico de gastroenteritis aguda en niños, causando diarrea severa y deshidratación grave. En células en cultivo, la infección con rotavirus produce una reorganización del citoesqueleto de actina, sin embargo no es claro el papel que tiene esta estructura celular en la replicación del virus. Con el propósito de investigar su importancia, utilizamos dos enfoques metodológicos: el uso de fármacos que alteran al citoesqueleto de actina y el silenciamiento de proteínas involucradas en la adecuada dinámica del mismo. Se observó que el jasplakinólido, fármaco que induce la polimerización y estabiliza el filamento de actina (Holzinger, 2009), no altera la formación de partículas infecciosas en células infectadas, sin embargo inhibe la liberación del virus en un 60%. Históricamente se ha pensado que los virus no envueltos son liberados de células no polarizadas por medio de lisis celular (Tucker y Compans, 1993), sin embargo, en este trabajo encontramos que en células MA104 no polarizadas, rotavirus comienza a salir a partir de las 9 horas post-infección (hpi), mientras que el daño celular causado por la replicación del virus se observa hasta las 12 hpi, lo cual sugiere que el virus es liberado por un mecanismo no lítico, al menos en tiempos tempranos de la infección, y que este mecanismo de liberación depende del citoesqueleto de actina. La caracterización del virus liberado en el sobrenadante celular por medio de gradientes de densidad en iodixanol sugirió que éstos se encuentran asociados a estructuras membranosas, ya que migran a zonas de baja densidad del gradiente y también encontramos que esta asociación no es afectada por jasplakinólido. Por microscopía de inmunofluorescencia encontramos que, en células infectadas tratadas con jasplakinólido, la proteína viral VP4 se acumula en una zona perinuclear, mientras que en células no tratadas con el fármaco, VP4 se distribuye de manera más uniforme en el citoplasma. Previamente se había reportado que VP4 se asocia intracelularmente a estructuras conocidas como balsas lipídicas, ricas en colesterol y esfingolípidos, y que se transporta a la membrana plasmática en células MA104 infectadas (Cuadras *et al.*, 2006; Nejmeddine *et al.*, 2000). En este trabajo confirmamos la presencia de VP4 en la superficie celular y encontramos que en presencia de jasplakinólido el transporte de VP4 hacia la membrana plasmática disminuye en un 50% y que la interacción del virus con balsas lipídicas también decrece en presencia del fármaco. Finalmente, demostramos que la proteína VP4 presente en la superficie celular se ensambla en las nuevas partículas virales liberadas al medio, lo cual indica que, al menos parte de la morfogénesis del virus ocurre en la membrana celular, a través de un mecanismo que requiere de la funcionalidad del citoesqueleto de actina. Este hallazgo es completamente novedoso, y contrasta

con la idea de que el ensamble final de la partícula viral ocurre en las cisternas del retículo endoplásmico.

Por otro lado, utilizando el sistema de RNA de interferencia, se llevó a cabo en nuestro laboratorio un tamizaje de genes celulares involucrados en el transporte intracelular de vesículas, que pudieran ser importantes para la replicación del virus (Silva-Ayala, datos no publicados). En este tamizaje se encontró que las proteínas Actn, Diaph y Rac1, involucradas en la reorganización del citoesqueleto de actina, son necesarias para el ciclo viral. En este trabajo nos propusimos corroborar esos datos y dilucidar la etapa del ciclo de replicación del virus en el cual se requieren. Observamos que la proteína Actn participa en la entrada de rotavirus, ya que su silenciamiento redujo la infectividad en un 50%, sin embargo al transfectar por lipofección DLPs, evitando el paso de entrada, la infectividad del virus no se afecta en células silenciadas. El silenciamiento de la proteína Diaph disminuyó la progenie viral en un 40%, interviniendo también en el paso de entrada del virus, además, por medio de Western blot observamos que esta proteína también participa en la síntesis de proteínas virales. Los ensayos de interferencia de Rac1 decrecieron la progenie viral en un 60% y por ensayos de Western blot demostramos que esta proteína se requiere para la síntesis de proteínas virales, sin embargo, observamos que también es requerida para síntesis de proteínas celulares, pudiendo inhibir la producción de virus infeccioso de manera indirecta. Los datos que obtuvimos en este trabajo sugieren que el citoesqueleto de actina participa activamente en la replicación de rotavirus, tanto a nivel de entrada como en la liberación del virus a tiempos tempranos de la infección.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de los rotavirus

Rotavirus es una de las principales causas de gastroenteritis en niños menores de 5 años a nivel mundial y puede ocasionar la muerte de los infantes ya que genera una severa deshidratación y un desbalance electrolítico (Parashar *et al.*, 2006). A pesar de los esfuerzos en la difusión de la vacunación contra este agente etiológico, aún sigue representando un serio problema de salud a nivel mundial, ya que tan solo en el año 2013 la Organización Mundial de la Salud estimó que cerca de 215,000 niños murieron debido a la infección con rotavirus.

El género *Rotavirus* pertenece a la familia *Reoviridae*, es un virus icosaédrico, no envuelto, de 70nm de diámetro, su genoma está organizado en 11 fragmentos de RNA de doble cadena que se hallan envueltos en tres capas de proteínas. El genoma viral codifica para seis proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6, VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6). La capa más interna del virión se conforma de 60 dímeros de la proteína VP2, la cual rodea el genoma del virus, además de 12 copias de VP1, la RNA polimerasa dependiente de RNA, y a 12 copias de VP3, con actividad de guanil transferasa, metilasa y fosfodiesterasa. La capa intermedia está compuesta por 260 trímeros de VP6, los cuales al ensamblarse sobre la capa de VP2 forman partículas de doble cápside, también llamadas DLPs, del inglés *double-layered particles* (Figura 1a). La capa más externa se compone de 260 trímeros de VP7 y 60 trímeros de VP4, que al ensamblarse sobre la capa de VP6 forman partículas de triple cápside, denominadas TLPs, del inglés *triple-layered particles* (Figura 1b), las cuales son infecciosas (Estes y Greenberg, 2013).

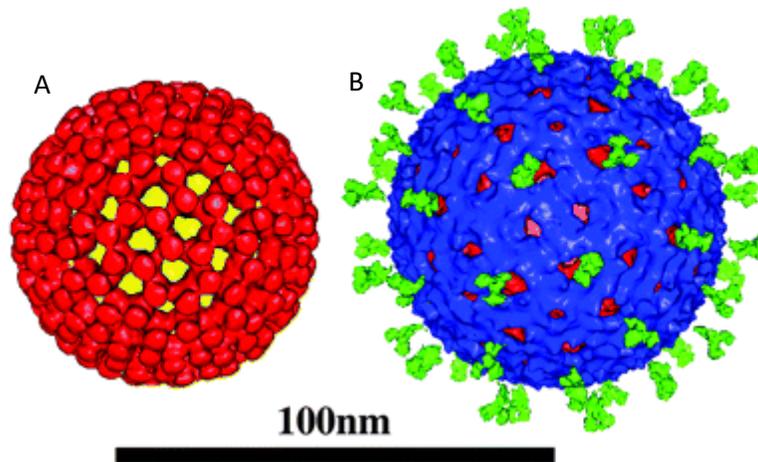


Figura 1. Imágenes de reconstrucciones 3-D de las partículas de rotavirus. A) Partícula de doble cápside (DLP), en amarillo se observa la capa interna (VP2) y en rojo la capa intermedia (VP6), B) Partícula de triple cápside (TLP), en rojo se observa la capa intermedia (VP6), en azul la capa externa (VP7) y en verde la proteína VP4, la cual forma las espículas del virión. Tomado de Libersou *et al.*, 2008.

Ciclo de replicación

Adsorción y penetración a la célula

El primer paso en el ciclo de replicación de rotavirus es la interacción que tiene la partícula viral con la superficie de la célula huésped. Esta adhesión es llevada a cabo por las proteínas de capa externa VP4 y VP7 con diferentes receptores y co-receptores celulares (López *et al.*, 2006), entre los cuales se han identificado al ácido siálico (Dormitzer, 2002), las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 4\beta 1$ (Coulson *et al.*, 1997; Gutiérrez *et al.*, 2010), además de la proteína de choque térmico hsc70 (Guerrero *et al.*, 2002). Se ha descrito que todos estos receptores relacionados con el reconocimiento de rotavirus se encuentran asociados a balsas lipídicas (Isa, 2004) (Figura 2).

Posterior a la unión del virus con la célula, su internalización hacia el interior de la célula se lleva a cabo por un proceso endocítico, el cual puede variar dependiendo de la cepa. Por ejemplo, la cepa de rotavirus RRV, aislada de un mono rhesus, requiere para su entrada colesterol y dinamina y no depende de clatrina ni

caveolina; sin embargo, la cepa UK, de origen bovino, penetra por una endocitosis mediada por clatrina (Gutiérrez *et al.*, 2010). El desnudamiento del virus y su salida del endosoma hacia el citoplasma requiere de diversos factores, como la disociación de las proteínas de la capa externa (VP7), además de un cambio conformacional de VP4, que origina el pliegue de VP5 sobre sí mismo adoptando una conformación tipo “paraguas” que expone un dominio hidrofóbico de la proteína que desestabiliza la membrana endosomal (Trask *et al.*, 2010).

Transcripción del genoma viral y traducción

Las DLPs son transcripcionalmente activas, ya que rotavirus posee su propia maquinaria de transcripción, la cual se encuentra en el núcleo del virión y consiste en VP1 y VP3, sin embargo otros estudios han descrito también a VP6 como una proteína esencial para la transcripción del genoma (Jayaram *et al.*, 2004). Los mRNAs son sintetizados dentro del virión de manera coordinada con su extrusión hacia el citoplasma a través de los poros que existen en las partículas de doble capa, llegando a ser detectables a una hora post-infección (Patton, 1990). Estos transcritos tienen dos funciones: sirven como molde para que se sintetice la cadena de polaridad negativa durante la replicación del genoma viral y para dirigir la síntesis de proteínas del virus. La transcripción del RNA de rotavirus se efectúa de modo conservativo, es decir, las dos hebras del RNA genómico de doble cadena del virus permanecen dentro de las DLPs, mientras que las cadenas de RNA recién sintetizadas son translocadas como mRNA por medio de los canales existentes en los vértices de la partícula viral (Lawton *et al.*, 1997).

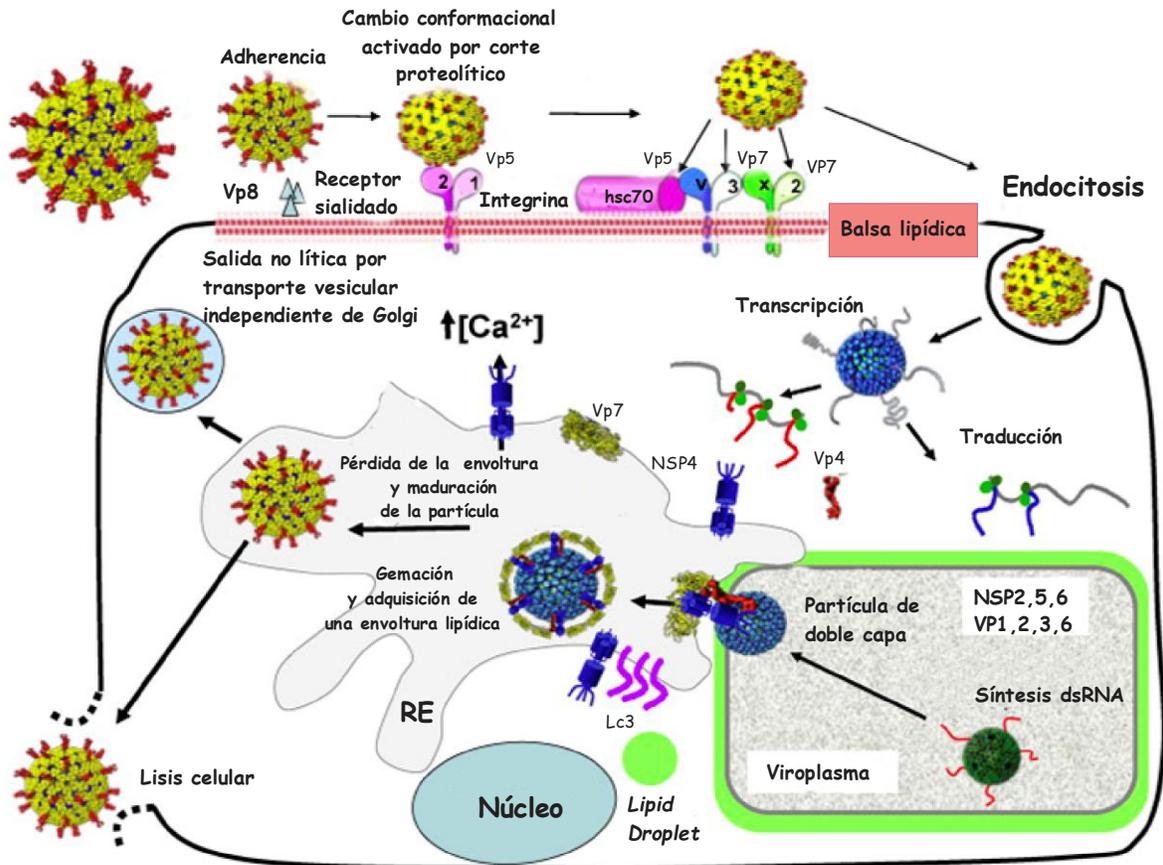
Los rotavirus son capaces de modular la maquinaria de traducción celular, causando una inhibición de la síntesis de proteínas celulares y de este modo favorecer la síntesis de proteínas virales. Los mRNAs de rotavirus no poseen una cola de poli-A, en su lugar tienen una secuencia consenso (GACC) en su extremo 3', la cual se encuentra conservada en los once genes (Poncet *et al.*, 1994). Esta secuencia funciona como “*enhancer*” en la traducción de los mRNAs virales, interaccionando principalmente con la proteína no estructural NSP3, y

probablemente con otras proteínas del virus (Gratia *et al.*, 2015). La traducción de los mRNAs de rotavirus produce las proteínas estructurales y no estructurales del virus. NSP2 y NSP5, dos proteínas no estructurales, son necesarias para producir las inclusiones citoplasmáticas denominadas viroplasma, los cuales son sitios de empaquetamiento del ssRNA (+) en las nuevas partículas virales que se están ensamblando, mientras es simultáneamente replicado a dsRNA (Patton *et al.*, 2006). El viroplasma parece estar dividido en dos zonas, de acuerdo a la distribución de las proteínas virales que lo componen. La región más interna está enriquecida con las proteínas NSP2 y NSP5, así como las proteínas del core VP1 y VP2 (Altenburg *et al.*, 1980; González *et al.*, 2000), sugiriendo que en esta zona se forma el *core* (partículas de una sola capa o SLP, del inglés *single-layered particle*) de la nueva progenie viral, y ocurre la replicación del genoma y su empaquetamiento. La zona más externa del viroplasma parece estar enriquecida por la proteína VP6, la cual es necesaria para la formación de la DLP a partir del *core* previamente formado (López *et al.*, 2005). Las DLPs geman de los viroplasma hacia el retículo endoplásmico utilizando a NSP4, glicoproteína transmembranal del virus residente en la membrana del retículo endoplásmico, que es utilizada como receptor de las DLPs, al interactuar con la proteína VP6 en la superficie de las DLPs (Taylor *et al.*, 1996).

Maduración y salida de la partícula viral

Al gemar a través de la membrana del retículo endoplásmico las DLPs adquieren un capa lipídica, en las cuales se encuentran presentes las proteínas NSP4 y la glicoproteína de superficie VP7. Por un mecanismo aún no definido la cubierta de lípidos se pierde cuando las partículas envueltas migran hacia el interior del lumen del retículo endoplásmico, perdiéndose también NSP4 y se adquiere la capa externa del virus compuesta de VP7 (Estes y Greenberg, 2013). La etapa en la cual la proteína VP4 se incorpora a la progenie viral aún no se ha dilucidado completamente. Una primera hipótesis está basada en estudios donde se observa que VP4 se asocia al complejo VP7-NSP4 localizado en las membranas del retículo endoplásmico (Maass y Atkinson, 1990); de este modo, al gemar las DLPs

por el retículo endoplásmico se asociaría a estos complejos VP4-NSP4-VP7 y resultaría en el ensamblado de la tercera capa del virus en el lumen del retículo. Sin embargo, otros estudios han demostrado que VP4 se localiza en balsas lipídicas en la membrana plasmática (Sapin *et al.*, 2002), lo que plantea la hipótesis de que las DLPs salen del viroplasma, geman a través del retículo endoplásmico e interaccionan con los complejos VP7-NSP4, de este modo las partículas adquieren la proteína de capa externa VP7. Posteriormente las vacuolas derivadas del retículo, que contienen a las partículas de triple capa, interaccionan con las balsas lipídicas, favoreciendo la integración de VP4 a las partículas virales recién sintetizadas (Delmas *et al.*, 2004a). Esta partícula de tres capas representa al virus maduro, infeccioso, el cual se ha asumido históricamente que se libera de células en cultivo no polarizadas, por lisis celular (McNulty *et al.*, 1976), por ejemplo en el caso de las células epiteliales de riñón de mono MA104 (Ver Figura 2). Por otro lado, se ha descrito que el virus se libera de células Caco-2 polarizadas, de origen epitelial de intestino grueso, por un proceso de gemación no lítico (Gardet *et al.*, 2006).



superficie celular, posterior a lo cual se unen a co-receptores celulares, incluyendo integrinas y a la proteína hsc70. La internalización se lleva a cabo por vía endocítica, que conduce a la partícula hacia endosomas tempranos o tardíos (dependiendo de la cepa). La tercera capa de rotavirus es removida y esto libera a las DLPs, las cuales son partículas transcripcionalmente activas. Comienza la síntesis de mRNA viral, el cual es usado para sintetizar las proteínas del virus. Después de que se sintetizan las proteínas virales, se forman los viroplasmos, lugar donde ocurre la replicación del RNA genómico y la formación de nuevas DLPs. Se ha propuesto que los viroplasmos interactúan con *lipid droplets*, sin embargo esta propuesta está aún en debate. En el retículo endoplásmico (RE) se encuentra anclada la glicoproteína viral NSP4, la cual funciona como receptor de las nuevas DLPs ensambladas, las cuales comienzan a gemar hacia el retículo. NSP4 co-localiza con el marcador de autofagia LC3 y posee actividad de viroporina, puesto que favorece la liberación de Ca^{2+} hacia el citoplasma. Las DLPs adquieren momentáneamente una capa lipídica dentro del RE, sin embargo esta es removida cuando la partícula adquiere su capa externa, compuesta por las proteínas VP7 y VP4. La

liberación del virus es llevada a cabo por lisis celular o en el caso de células epiteliales polarizadas por un mecanismo no lítico. Adaptada de Estes y Greenberg, 2013.

El desarrollo del ciclo viral es auxiliado por factores celulares que en parte son modulados por acción del virus. Una de las estructuras celulares que se ve afectada es el citoesqueleto de actina, el cual se reorganiza durante la infección (Taylor *et al.*, 2011).

Citoesqueleto de actina

El citoesqueleto de actina interviene en una gran variedad de funciones que son esenciales en todas las células, ya que participa en dar estructura y forma a la célula, además de que sus propiedades dinámicas favorecen el movimiento y división celular (Hall, 1998). Las moléculas individuales de actina son proteínas globulares de 375 aminoácidos denominadas G-actina. Estos monómeros de actina interaccionan entre sí, llegando a polimerizarse para formar filamentos de actina (F-actina). Dado que estos filamentos se organizan por monómeros orientados en una misma dirección, la F-actina tiene polaridad, por lo que sus extremos terminales (llamados extremo positivo y negativo) son distinguibles uno del otro (Cooper, 2000). Estos microfilamentos de actina son estructuras de 7 a 9 nm de diámetro unidas por uniones no covalentes de subunidades de actina dispuestos en hélices de redes bidimensionales y geles tridimensionales que se encuentran dispersos en todo el citoplasma celular, sin embargo se hallan más concentrados en la corteza, justo debajo de la membrana plasmática, por lo que se le denomina actina cortical (Alberts *et al.*, 2002).

Polimerización y despolimerización del filamento de actina

El filamento de actina es sometido a diferentes procesos de regulación que le permiten ensamblarse y desensamblarse rápidamente dependiendo de las necesidades de la célula. En estudios *in vitro* se ha observado que el polímero de actina se despolimeriza a G-actina en soluciones con baja fuerza iónica, y al aumentar la fuerza iónica a niveles fisiológicos la actina comienza a polimerizarse espontáneamente (Cooper, 2000). El primer paso para la polimerización de la

actina es la nucleación, la cual consiste en la formación de pequeños agregados de tres monómeros de actina. Posterior a esto, el filamento comienza a crecer, puesto que las subunidades de actina se van adicionando en los extremos del filamento. En el extremo positivo la incorporación de G-actina es entre cinco y diez veces más rápida en comparación al extremo negativo, mientras que en este extremo del filamento los monómeros se van disociando más rápidamente. Este mecanismo de recambio entre polimerización/despolimerización del filamento de actina es conocido como dinámica de ensamblaje (*treadmilling*, en inglés) (Wegner e Isenberg, 1983). Este proceso requiere ATP, donde la actina unida a ATP polimeriza en el extremo positivo y la actina unida a ADP es disociada del extremo negativo (Figura 3)

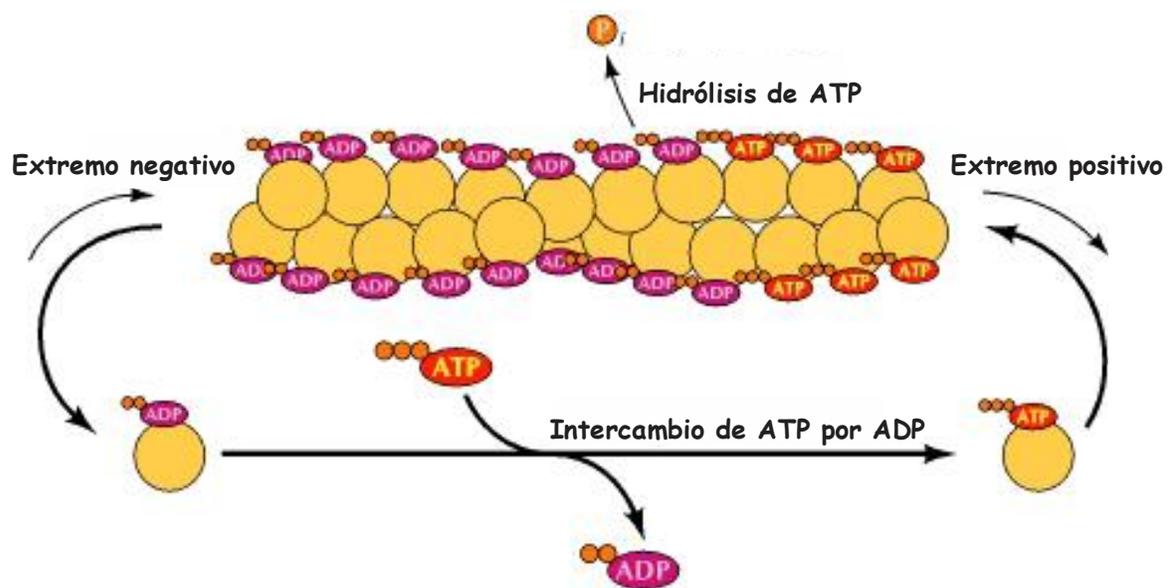


Figura 3. Dinámica de ensamblaje (*treadmilling*). La actina unida a ATP se asocia con el extremo positivo, elongando al filamento y posteriormente el ATP es hidrolizado a ADP. Como la actina unida a ADP se disocia más rápidamente que la actina-ATP, existe un desacoplamiento de actina en el extremo negativo. Adaptada de Cooper, 2000.

Compuestos químicos que afectan la dinámica del citoesqueleto de actina

Existen fármacos que alteran el citoesqueleto de actina, los cuales son derivados de toxinas naturales que producen plantas, hongos o esponjas, como mecanismo de defensa (Alberts *et al.*, 2002). Estas drogas poseen diferentes mecanismos de acción, ya que pueden llegar a unirse al filamento completo o a las subunidades del polímero (Tabla 1), y se han aprovechado como herramientas en el estudio de la dinámica del citoesqueleto.

Tabla 1. Drogas que afectan al citoesqueleto de actina. Adaptada de Alberts *et al.*, 2002.

Fármaco	Efecto en el filamento	Mecanismo de acción	Origen
Citocalasina	Despolimeriza	Se une al extremo “+” del filamento de actina, evitando su polimerización	Hongos
Faloidina	Estabiliza	Se une y estabiliza el filamento de actina	Hongos del género <i>Amanita</i>
Jasplakinólido	Estabiliza	Se une y estabiliza al filamento de actina. También es capaz de inducir la polimerización del mismo.	Esponja marina
Latrunculina	Despolimeriza	Se une a las subunidades de actina, evitando su polimerización	Esponja marina
Swinólido	Despolimeriza	Corta al filamento de actina	Esponja marina

Proteínas de unión a actina

La actina monomérica puede polimerizarse en un filamento y desacoplarse nuevamente en condiciones *in vitro*, sin embargo, dentro de la célula existen numerosas proteínas que son capaces de unirse al monómero o al filamento de actina y que regulan la dinámica del citoesqueleto. Estas proteínas son capaces de organizar espacial y temporalmente a la actina, controlando la disponibilidad de G-actina, la nucleación del filamento, su elongación y despolimerización (Alberts *et al.*, 2002).

Un importante regulador de la elongación del filamento de actina es la profilina, la cual se une a los monómeros libres, estimulando el intercambio de actina-ADP por actina-ATP y de este modo facilita la polimerización (Lassing y Lindberg, 1985). Su contraparte, la timosina, secuestra las subunidades de actina, inhibiendo su polimerización (Goldschmidt *et al.*, 1992). Otra proteína clave en la despolimerización del filamento es la cofilina. Esta proteína puede unirse al filamento de actina y favorece la disociación de los monómeros en el extremo negativo (Hawkins *et al.*, 1993). Además llega a cortar al filamento, generando más extremos negativos y por ende desensamblando al filamento de actina. La cofilina también es capaz de unirse a la actina-ADP, previniendo que vuelva a reincorporarse al filamento (Cooper, 2000). La nucleación *de novo* requerida para el ensamblaje del polímero utiliza a las proteínas Arp2 y Arp3 (Arp2/3), apoyadas de otras proteínas como las forminas. De este modo, proteínas como profilina, cofilina, Arp2/3 y forminas, entre otras (Figura 4), actúan de manera conjunta para remodelar al citoesqueleto de actina, dependiendo de los requerimientos celulares. Debido a los diferentes mecanismos por los cuales los microfilamentos pueden ser polimerizados/despolimerizados, existe una gran variedad de vías de señalización celular que permiten a la célula modular al citoesqueleto, siendo uno de los más importantes el sistema de las Rho-GTPasas.

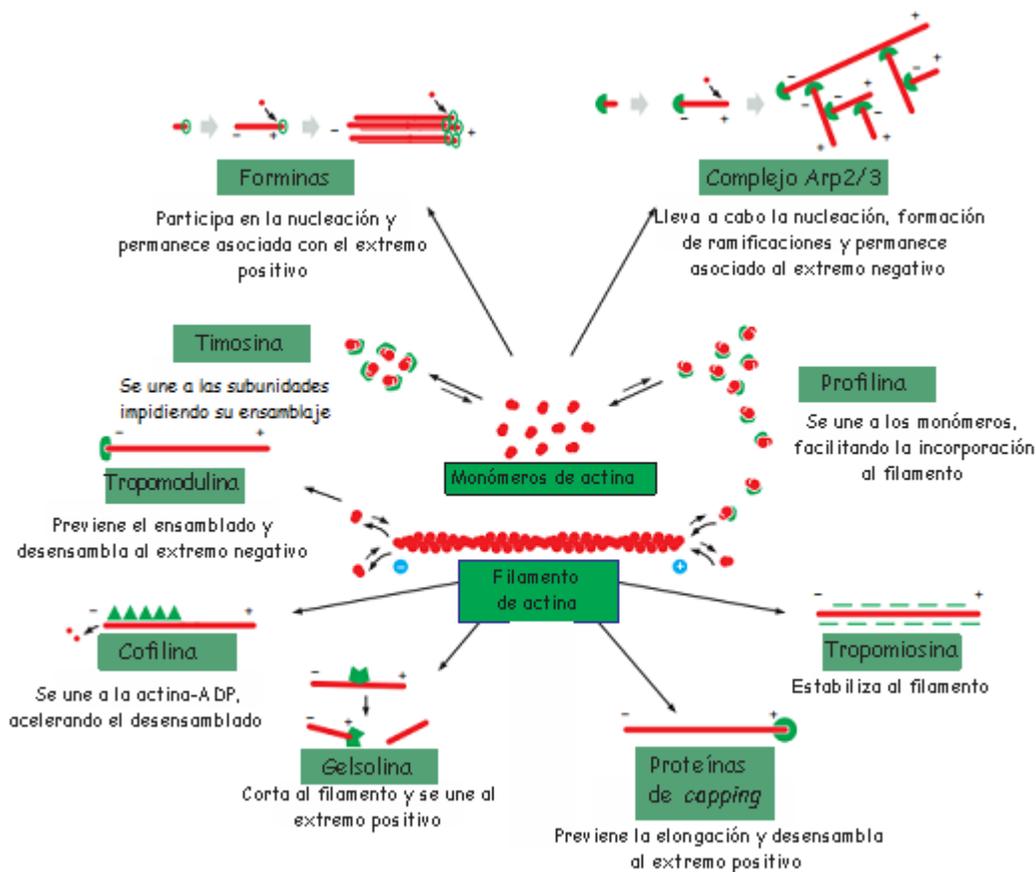


Figura 4. Proteínas que participan en la organización del citoesqueleto de actina. Los monómeros y el filamento de actina son sometidos a polimerización o despolimerización dependiendo de las necesidades celulares, lo cual es regulado por diferentes proteínas de unión a actina. Adaptada de Alberts *et al.*, 2002.

Sistema Rho-GTPasas

Las Rho-GTPasas fueron descubiertas en los años ochenta en levaduras y mamíferos y se catalogaron dentro de la superfamilia Ras, las cuales están compuestas de pequeñas GTPasas monoméricas con un peso de 21-25 kD (Hall, 1990). En mamíferos, la familia de Rho-GTPasas comprende 20 miembros (Heasman y Ridley, 2008), y su localización celular depende de las modificaciones

post-traduccionales a las que son sometidas, por lo que muchas de ellas pueden encontrarse libres en el citosol y otras ancladas a membrana (Boivin y Beliveau, 1995).

Mecanismos de señalización de las Rho-GTPasas

En la mayoría de las Rho-GTPasas los primeros pasos en su activación comienzan con la interacción de un ligando con un receptor celular en la membrana plasmática, incluyendo tirosin cinasas, receptores acoplados a proteínas G y varios receptores de citocinas (Hall y Nobes, 2000). La señalización de estas GTPasas monoméricas involucra un estado “encendido” o activo, al estar unidas a GTP y un estado “apagado” o inactivo al estar unidas a GDP. El ciclo entre el estado activo e inactivo de estas GTPasas es regulado por tres grupos de proteínas: los factores intercambiadores de guanina (GEFs, por sus siglas en inglés, “*guanine nucleotide-exchange factors*”), las proteínas que activan a la GTPasa (GAPs, por sus siglas del inglés, “*GTPase-activating proteins*”) y los inhibidores de disociación de nucleótidos de guanina (GDIs, por sus siglas en inglés, “*guanine nucleotide-dissociation inhibitors*”) (Figura 5). En humanos se han descrito cerca de 70 GEFs, las cuales facilitan el intercambio de nucleótidos en las Rho-GTPasas, promoviendo la liberación de GDP al mismo tiempo que la unión de GTP (Rossman *et al.*, 2005). Se conocen alrededor de 80 GAPs en mamíferos, las cuales activan la función de las Rho-GTPasas, al promover la hidrólisis del GTP (Tcherkezian y Lamarche-Vane, 2007). En mamíferos se han reportado tres GDIs, estas proteínas se unen a los grupos prenilo de algunas proteínas Rho, secuestrándolas y manteniéndolas lejos de sus respectivos blancos (Dovas y Couchman, 2005).

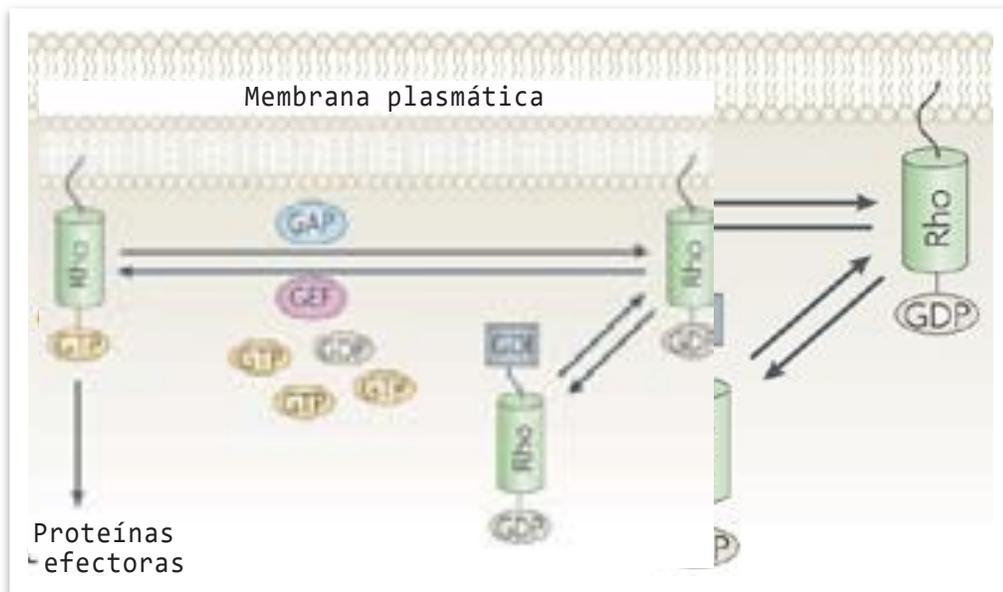


Figura 5. Activación de las Rho-GTPasas. En un estado inactivo, las GTPasas Rho se encuentran unidas a GDP o se encuentran inhibidas al estar unidas a proteínas GDI. Para activarse, es necesario que las proteínas GEF intercambien el GDP por GTP en las proteínas Rho, esto las activa y pueden interactuar con diferentes proteínas efectoras. Para regresar a su estado inactivo, las proteínas GAPs promueven la actividad intrínseca de GTPasa de las proteínas Rho, generándose la Rho-GTPasa-GDP. Adaptada de Heasman y Ridley, 2008.

La unión del ligando activa los GEFs, lo cual promueve la activación de las proteínas Rho. Una vez activadas, las Rho-GTPasas median su efecto celular al interactuar con sus proteínas blanco, activando tirosin cinasas, serin y treonin cinasas, fosfolipasas, proteínas de andamiaje, entre varias otras. Las proteínas blanco activadas son responsables de diversas funciones , como la progresión del ciclo celular, la expresión de ciertos genes o la reorganización del citoesqueleto de actina, sin embargo aún se desconoce la función de varias de ellas (Hall, 2012).

Regulación del citoesqueleto de actina por Rho-GTPasas

A pesar de que las proteínas Rho fueron descubiertas en la década de los ochenta, fue hasta mediados de los noventa cuando tres de ellas, Rho, Rac y CDC42, se vincularon directamente en la organización del citoesqueleto de actina (Ridley y Hall, 1992; Ridley *et al.*, 1992; Nobes y Hall, 1995).

CDC42

La proteína CDC42 tiene como funciones principales regular el citoesqueleto de actina y la polaridad celular en diversos organismos eucariotas (Heasman y Ridley, 2008). En muchos tipos celulares es responsable de la formación de filopodios (Nobes y Hall, 1995) (Figura 6), los cuales son proyecciones citoplasmáticas altamente dinámicas y ricas en actina (Figura 8). Estas estructuras contienen haces paralelos de F-actina y son importantes para que las células puedan sentir el ambiente en el que se encuentran, están involucradas en la adhesión a la matriz extracelular y también llegan a participar en la locomoción celular (Gupton y Gertler, 2007).

Rac

Esta GTPasa posee tres isoformas activas (Rac1, Rac2 y Rac3), sin embargo se expresan de manera diferencial dependiendo del tipo celular. Rac1 es el miembro mejor estudiado y se expresa de manera ubicua, mientras que la expresión de Rac2 está restringida a células hematopoyéticas (Shirsat *et al.*, 1990) y Rac3 se encuentra principalmente en el cerebro (Corbetta, 2005). Rac1 participa en la migración celular y promueve la polimerización de actina en la periferia celular llevando a cabo la formación de plegamientos de la membrana y lamelipodios (Figura 6). Estas últimas estructuras son prolongaciones laminares transitorias producidas por la polimerización de actina debajo de la membrana plasmática (Figura 8). Una vez que Rac es activada puede interactuar con proteínas que conducen la nucleación del filamento de actina, incluyendo al complejo Arp 2/3 a través de proteínas WAVE y forminas (Jaffe y Hall, 2005). Rac también puede remover las proteínas de *capping* del extremo positivo del filamento e incrementar la disponibilidad de G-actina regulando la actividad de cofilina (Jaffe y Hall, 2005; Wang *et al.*, 2007).

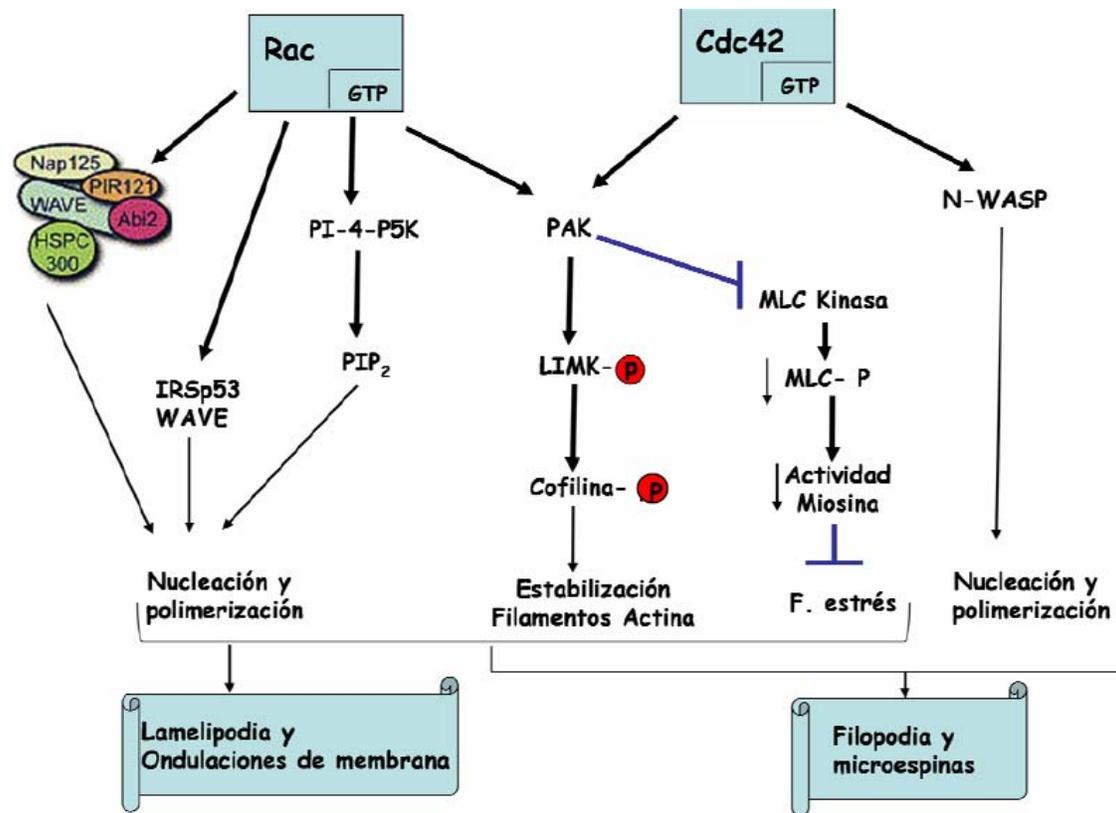


Figura 6. Señalización de Rac y CDC42 en la reorganización del citoesqueleto de actina. La formación de filopodios y lamelipodios son favorecidos por la activación de CDC42 y Rac a través de varias cinasas y diferentes proteínas efectoras. Estas dos GTPasas pueden llegar a converger en algunas vías para estabilizar al filamento. PAK, cinasa activa p-21; LIMK, cinasa LIM; MLC, cadena ligera de miosina. Modificado de Burridge y Wennerberg, 2004.

Rho

Se conocen tres isoformas de Rho (RhoA, RhoB y RhoC), y todas ellas promueven la formación de fibras de estrés (Figura 7) y complejos de adhesiones focales (Hall y Nobes, 2000). Se ha observado que RhoB se encuentra localizado en vesículas endocíticas y es capaz de regular el tráfico endosomal (Ridley, 2006). Estas proteínas Rho actúan como los primeros interruptores en la señalización

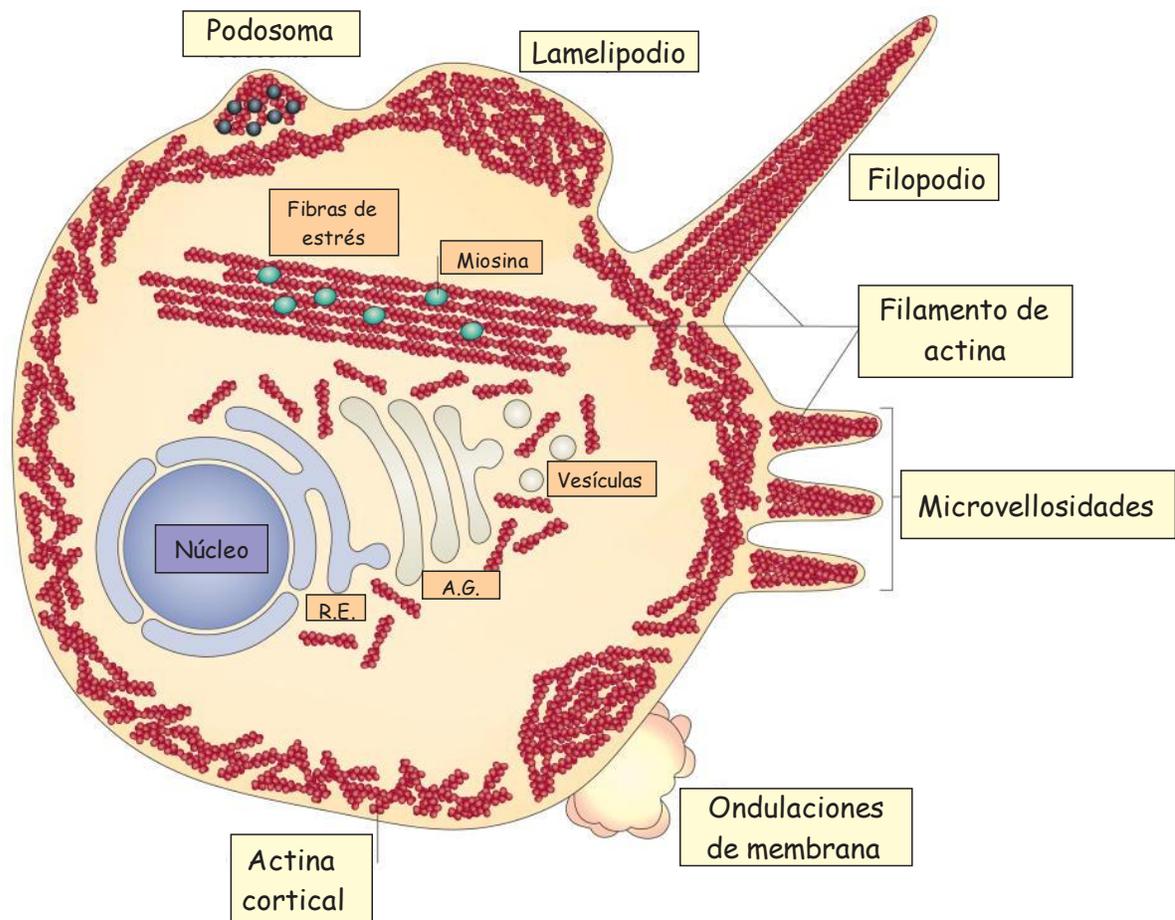


Figura 8. Diferentes rearrreglos del citoesqueleto de actina. El citoesqueleto de actina es una estructura altamente dinámica que puede polimerizarse/despolimerizarse formando diferentes estructuras, dependiendo de las necesidades celulares o en respuesta a diferentes estímulos ambientales. A.G., Aparato de Golgi; R.E., Retículo endoplásmico. Adaptada de Taylor *et al.*, 2011.

Rol del citoesqueleto de actina en infecciones virales

El citoesqueleto de actina es una estructura que interviene en numerosas funciones celulares, por lo que no es de sorprender que sea reorganizado para optimizar el ciclo de infección de muchos virus. Las primeras asociaciones entre una infección viral y la alteración del citoesqueleto provienen de “células transformadas”¹ por virus como SV40, adenovirus, virus del sarcoma de Rous, entre otros, los cuales generan cambios morfológicos como redondeamiento

1. Células transformadas es un término que se refiere a células alteradas morfológicamente y que proliferan de manera anormal, puesto que suelen perder la inhibición de crecimiento al contacto. De manera general este proceso se efectúa por una desregulación del ciclo celular e inhibición de la apoptosis por proteínas virales.

celular, formación de pseudópodos, pérdida de fibras de estrés, así como pérdida de la inhibición del crecimiento por contacto (Fleissner y Tress, 1973; Goldman *et al.*, 1975). A partir de entonces se ha observado que el grado de alteración en el citoesqueleto varía entre diferentes infecciones virales, la etapa del ciclo replicativo del virus y el tipo de célula infectada (Taylor *et al.*, 2011).

Papel de la actina dentro del ciclo viral

Entrada

El primer paso en una infección viral es el proceso de entrada, donde las proteínas virales de superficie interactúan con receptores celulares. Estos receptores se encuentran asociados a filamentos de actina situados debajo de la membrana plasmática y en muchos casos la interacción virus-receptor desencadena el movimiento de la partícula viral (“*surfing*”) hacia el lugar donde ocurre la endocitosis (Lehman *et al.*, 2005). En otros casos la adherencia del virus a la célula genera que sean los receptores celulares los que se agrupan (movimiento mediado por el citoesqueleto) cerca del punto de contacto virus-célula y de este modo faciliten la entrada del virus (Jimenez-Baranda *et al.*, 2007). La mayor parte de los virus entran a la célula por endocitosis (Mercer *et al.*, 2010), y con frecuencia se requiere de la actina para que el proceso se lleve a cabo, ya que al utilizar drogas que interfieren con el funcionamiento del citoesqueleto de actina algunos virus son incapaces de entrar a la célula (Mercer y Helenius, 2008; Greene y Gao, 2009).

Replicación del genoma viral y morfogénesis

El proceso por el cual el virus replica su genoma y lo empaqueta dentro de las cápsides víricas debe ser perfectamente coordinado para asegurar que se produzcan virus infecciosos. La participación de la actina en este proceso puede darse en dos formas: en algunos virus, como el virus Sincitial Respiratorio (RSV), la actina es necesaria para que el genoma se replique adecuadamente,

funcionando como factor de transcripción o estabilizando al genoma viral, sin embargo los mecanismos exactos de cómo interactúa la actina con el ácido nucleico aún falta por determinarse (Harpen *et al.*, 2009). Por otro lado, el citoesqueleto de actina puede transportar al genoma y las proteínas virales a sitios específicos de la célula donde el ensamblado se lleva a cabo, como en el caso del virus de Newcastle (NDV) y el virus Sendai (SV) (Taylor *et al.*, 2011).

Salida del virus y su diseminación a otras células

La progenie viral recién sintetizada debe salir de la célula infectada para poder infectar otras células. En el caso de algunos virus envueltos que salen de su célula huésped por gemación, como HIV o el virus del Sarampión (MV), se ha observado que el citoesqueleto de actina es determinante en la maduración y liberación de las partículas virales (Fackler y Kräusslich, 2006; Stallcup *et al.*, 1983). Las proteínas virales pueden interactuar directamente con el sistema RhoGTPasa o con algunas proteínas efectoras, lo que provoca la formación de citonemas, filopodios o lamelipodios, y le permiten al virus salir de la célula y/o infectar células aledañas (Taylor *et al.*, 2011).

ANTECEDENTES

Rotavirus modifica el citoesqueleto de actina

Se ha observado que en células infectadas con rotavirus la estructura y función del citoesqueleto sufren modificaciones; a 24 horas post-infección (hpi) la actina incorporada en microfilamentos (F-actina) sufre una despolimerización en las microvellosidades de células Caco-2 (carcinoma de colon) polarizadas (Jourdan *et al.*, 1998). Existen reportes de modificaciones en la dinámica del citoesqueleto independientes de la homeostasis del calcio intracelular, tal es el caso de la formación de fibras de estrés de actina en células MA104 (riñón de mono verde) no polarizadas a 3 hpi, y el cambio en la conformación de algunas proteínas de los filamentos intermedios en células Caco-2 a 18 hpi (Zambrano *et al.*, 2012; Brunet *et al.*, 2000).

Interacciones entre proteínas virales y actina

Existen algunos reportes de proteínas virales que parecen interactuar con el citoesqueleto. En células Cos-7 y MA104 se demostró que a 7 hpi la proteína NSP4 está implicada en la variación de calcio intracelular, lo que puede llevar a una alteración de las proteínas que se encargan de organizar al citoesqueleto (Zambrano *et al.*, 2008). Por otro lado, en células Cos-7 transfectadas con un vector que expresa la proteína estructural VP4, se observó la interacción específica de VP4 con haces de filamentos de actina citoplásmica y su remodelación para formar agregados o cuerpos de actina 24 h después de la transfección (Gardet *et al.*, 2006). Se reportó también que, en células Caco-2 polarizadas, VP4 co-localiza con F-actina a 6 hpi y remodela los haces de filamentos subcorticales en el *brush border* de la células, desorganizando su estructura y probablemente favoreciendo la salida del virus (Gardet *et al.*, 2006). En cultivos diferenciados de células Caco-2 se ha observado que existe un decremento en la salida apical de rotavirus por efecto del fármaco jasplakinólido, con aumento en su salida por la región basolateral (Gardet *et al.*, 2007), lo cual contrasta con la liberación del virus en un sistema no polarizado (como el caso de

células MA104), la cual se asume que es llevada a cabo por un proceso de lisis celular (McNulty *et al.*, 1976).

A pesar de la información disponible, no es claro el papel que tiene el citoesqueleto de actina en la replicación de rotavirus. Aún se requieren determinar factores involucrados durante la interacción del virus con su célula hospedera que desencadenan cambios en la estructura y conformación del citoesqueleto para favorecer la replicación viral. Por ejemplo, experimentos efectuados en nuestro laboratorio demuestran que inhibidores de la polimerización de la actina afectan la entrada únicamente en ciertas cepas de rotavirus (Gutiérrez, 2011), además de que recientemente se demostró que la interferencia de la expresión de los genes Cdc42, RhoA y Actn, relacionados con el sistema Rho-GTPasas, disminuye la infectividad del rotavirus RRV, y que estas proteínas participan en el proceso de endocitosis del virus (Silva-Ayala *et al.*, 2013).

Por otro lado, en un tamizaje reciente llevado a cabo en nuestro laboratorio se identificaron varios genes celulares que codifican para proteínas involucradas en la dinámica del citoesqueleto que pudieran estar implicados en el ciclo de replicación de rotavirus. Dentro de estos se encuentran: Diaph, que actúa en el ensamblaje de la F-actina y formación de fibras de estrés y Rac1, GTPasa perteneciente a la superfamilia RAS involucrada en la inducción de plegamientos y extensiones de membrana (Silva-Ayala, datos no publicados).

HIPÓTESIS

El ciclo de replicación de rotavirus requiere de la dinámica del citoesqueleto de actina y de las proteínas Actn, Diaph y Rac1.

OBJETIVOS

General

Determinar el papel del citoesqueleto de actina en el ciclo de replicación de rotavirus.

Específicos

1. Determinar el efecto de drogas que afectan al citoesqueleto de actina en la producción de partículas infecciosas del rotavirus de simio RRV.
2. Validar si existe disminución de la infectividad del rotavirus RRV al silenciar por RNAi la expresión de los genes que codifican para Actn, Diaph y Rac1.
3. Evaluar los pasos del ciclo de replicación de rotavirus que se afectan al disminuir la síntesis de Actn, Diaph y Rac1 por RNAi.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células y virus. La línea celular MA104, derivada de epitelio de riñón de mono rhesus (*Cercopithecus aethiops*), se creció en medio DMEM-RS (*Dubecco's modified Eagle's minimal essential medium*) (Thermo Scientific) (Pittsburg, USA) en un ambiente con 5% de CO₂ a 37°C. La cepa de rotavirus RRV (rhesus rotavirus) se propagó en células MA104, previa activación con 10 µg/ml de tripsina a 37°C por 30 min. El virus RRV se añadió a células MA104 por 1 h a 37°C, posteriormente se retiró el inóculo, y se agregó MEM incubándose por un periodo de 14 h a 37°C. Para lisar las células se procedió a congelar y descongelar las células (2 veces) y se centrifugó a 600 x g por 10 min para retirar los restos celulares. El título viral fue determinado como se describe posteriormente, y el virus se almacenó en alícuotas a -70°C.

Anticuerpos y reactivos. Los anticuerpos policlonales contra la partícula viral completa (α-TLP), la proteína viral NSP2 y la proteína vimentina fueron producidos en nuestro laboratorio. Los anticuerpos monoclonales HS2 y 2G4 contra la proteína VP4 fueron donados por H.B. Greenberg (Universidad de Stanford, Calif., USA). Los anticuerpos contra las proteínas celulares Actn (Abnova) (Taipei, TW); Diaph (Abcam) (Cambridge, UK); Rac1 (Cytoskeleton, Inc.) (Denver, USA), se adquirieron comercialmente. Los anticuerpos secundarios utilizados para las inmunofluorescencias fueron anti-conejo y anti-ratón acoplados a Alexa-Fluor 568 (Molecular Probes) (USA). En los ensayos de inmunoperoxidasa se utilizó un anticuerpo de cabra anti-conejo acoplada a peroxidasa (Perkin Elmer Life Sciences) (Waltham, USA) y para la visualización de actina se utilizó faloidina acoplada a Alexa-Fluor 488 (Invitrogen™, USA). La citocalasina D se obtuvo de Sigma (St. Louis, USA) y la latrunculina B y el jasplakinólido de Calbiochem (Darmstadt, Alemania). Para los ensayos de biotilación de proteínas de membrana se utilizó Sulfo-NHS-LC-Biotina (ThermoFisher Scientific, USA) y las proteínas biotiladas fueron purificadas a través de perlas magnéticas de estreptavidina (New England BioLabs inc., USA). Los siRNA utilizados fueron de Dharmacon –Thermo Scientific (Pittsburg, USA).

Viabilidad celular. Las células fueron crecidas en placas de 96 pozos y procesadas con el fármaco o infección respectiva para cada ensayo. A diferentes tiempos, según el ensayo realizado, se evaluó la viabilidad por dos métodos. En el primero se determinó la liberación de la LDH (lactato deshidrogenasa), medida en el sobrenadante de las células, utilizando el kit Lactato Dehidrogenase kit TOX-7 (Sigma, México), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El segundo método consistió en medir la respiración celular utilizando Resazurina (7-Hidroxi-3H-fenoxazina-3-10-óxido) como indicador. Para esto, se agregaron 10 µl de resazurina (Biotium, U.S.A) a cada pozo y se incubaron las células por 2 h a 37°C, posterior a lo cual se midió la absorbancia a 570 nm y cada valor se ajustó a su respectivo control.

Tratamiento con inhibidores. Monocapas confluentes de células MA104 crecidas en placas de 96 pozos se lavaron dos veces con MEM y se inocularon con una multiplicidad de infección (MOI) de 3 durante 1 h a 37°C. Después de este tiempo el inóculo fue retirado, se lavaron las células con MEM y se trataron con citocalasina D, latrunculina B o jasplakinólido durante diferentes periodos de tiempo y a las concentraciones indicadas en cada ensayo, incubándose por 14 h a 37°C. Las células fueron congeladas y descongeladas dos veces, después de lo cual se procedió a colocar cada lisado en tubos estériles, centrifugándose para quitar restos celulares. Posteriormente las unidades formadoras de focos se calcularon utilizando un ensayo de inmunoperoxidasa.

Determinación del título viral. Este se llevó a cabo por un ensayo de inmunoperoxidasa. Brevemente, monocapas confluentes de células MA104 crecidas en placas de 96 pozos se lavaron dos veces con MEM y se añadió el virus (50 µl de lisado) por 1 h a 37°C. Posteriormente las células fueron lavadas con MEM y se incubaron por 14 h a 37°C. Después del tiempo de incubación las células fueron fijadas con acetona al 80% en buffer de fosfatos (PBS) por 20 min, después de lo cual se lavaron con PBS y se incubaron con α-TLP (1:2,000) por 1 h a 37°C. Posterior a este periodo se lavaron las células con PBS, incubándose con el anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa (1:3,000) por 1 h a 37°C. Por último, las células se lavaron nuevamente con PBS y se agregó carbazol y

peróxido de hidrógeno hasta observar el desarrollo de color. Se lavó con agua y las unidades formadoras de focos se contaron en un microscopio invertido (Nikon, Japón).

Inmunofluorescencia. Células MA104 confluentes crecidas en cubreobjetos de vidrio se infectaron a una MOI de 3 por 1 h a 37°C, el inóculo fue retirado y las células se lavaron con MEM. Posterior al tiempo de infección correspondiente, según el ensayo o el tratamiento con el fármaco respectivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído (Sigma) (St. Louis, USA) al 2% en PBS por 20 min a temperatura ambiente y permeabilizadas por 15 min con 0.5% de Tritón X-100 (Sigma) (St. Louis, USA) en solución de bloqueo (1% BSA (albúmina sérica bovina), en PBS con 50 mM NH₄Cl). Posteriormente las células fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente para cada experimento, diluido en solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente, después de lo cual se lavaron las células 3 veces por 5 min con PBS-NH₄Cl 50 mM. Se incubaron las células con el anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón acoplado a Alexa 568 por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente la monocapa se incubó con DAPI 30 nM (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Invitrogen™, USA) por 10 min y con faloidina acoplada a Alexa 488 por 20 min. Los cubreobjetos fueron montados con Citifluor AF1 (Electron Microscopy Sciences) (Hatfield, USA) en portaobjetos. Las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axioskop 2, Alemania) acoplada a una cámara digital (Photometrics Cool Snap HQ).

Lipofección reversa de siRNAs. Se realizó una mezcla de oligofectamina (Invitrogen™, USA) en MEM, (15 µl de oligofectamina por 1 ml de MEM) y se incubó a 37°C por 10 min. A la mezcla se añadieron diferentes concentraciones del siRNA correspondiente y se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 150 µl de una suspensión de 1x10⁵ células/ml en las placas de 96 pozos y 72 h después las células fueron procesadas.

Western blot. Células MA104 previamente tratadas con el siRNA correspondiente, muestras biotiniladas o muestras provenientes de un

fraccionamiento a través de un gradiente de densidad se lisaron con amortiguador de carga (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% β -mercaptoetanol) hirviendo las muestras por 5 min, y se analizaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 7.5 y 12.5%, en función del experimento. Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de Inmobilon (Milipore) (Darmstadt, Alemania) por 60 min a 130 mA. La membrana se bloqueó por 1 h a temperatura ambiente con agitación, con 5% de leche descremada (Carnation) en PBS-tween (0.1%). La membrana se incubó posteriormente con el anticuerpo primario diluido en la misma solución de leche por 1 h a temperatura ambiente. Acabada la incubación la membrana se lavó con PBS-tween (0.1%) tres veces por 10 min y se añadió el anticuerpo secundario (hecho en ratón o conejo, de acuerdo al experimento) acoplado a peroxidasa por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente se lavó la membrana nuevamente y se detectaron las proteínas utilizando el sistema Western Lightning (Perkin Elmer) (Waltham, USA) exponiéndose a una película hipersensible Kodak (Rochester, USA).

Fraccionamiento celular por gradiente de densidad. Células MA104 o CaCo-2 crecidas en frascos de 75cm² se infectaron con la cepa RRV a una MOI de 3. A 10 hpi (células MA104) o 18 hpi (células CaCo-2) los sobrenadantes fueron recolectados y los detritos celulares remanentes se removieron centrifugando a 600 x g por 15 min. Posteriormente el virus se concentró por centrifugación a 150 000 x g durante 2 h, el botón se resuspendió en TNC (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 140 mM, CaCl₂ 10 mM) y se mezcló con una solución de iodixanol (Sigma, México) hasta alcanzar un 40% de este compuesto, en un volumen final de 1.2 ml. Este volumen se colocó en un tubo de ultracentrífuga nuevo de 5 ml, y se generó un gradiente discontinuo de iodixanol, en TNC, añadiendo sobre la muestra de virus (1.2 ml), 1.5 ml de iodixanol 35%, 0.8 ml de iodixanol 30%, 0.8 ml de iodixanol 20% y 0.8 ml de iodixanol 15%. El gradiente se centrifugó a 150 000 x g por 4 h a 4 °C y posteriormente se colectaron fracciones de 400 μ l para su posterior procesamiento.

Biotinilación de proteínas de membrana. Células MA104 infectadas y tratadas o no tratadas con jasplakinólido se lavaron 3 veces con PBS frío. Posteriormente se

incubaron con 0,5 mg de NHS-LC-Biotina en buffer de biotinilación (trietanolamina 10 mM (pH 9); NaCl 150 mM; CaCl₂ 0,1 mM; MgCl₂ 1 mM) durante 30 min en hielo y nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS frío. Para bloquear la NHS-LC-Biotina libre, las muestras se incubaron con 50 mM NH₄Cl/PBS durante 10 min. Las células se lisaron incubando con buffer RIPA (Tris 10 mM (pH 7,4); NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Tritón X-100 1%; deoxicolato de sodio 0,5%; SDS 0,1%; aprotinina 1%) durante 10 min en hielo. Transcurrido el tiempo de incubación se colocaron 20 µl de perlas magnéticas de estreptavidina durante 1 h a temperatura ambiente. Después se realizaron 4 lavados a las perlas en el siguiente orden: RIPA; RIPA con 0,5 M de NaCl; RIPA/TNE (10mM Tris (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA) 1:1; TNE. Finalmente las perlas se resuspendieron en 40 µL de buffer de carga, conteniendo SDS 1% y 200 mM de ditiotreitól y se hirvieron durante 5 min.

Preparación de balsas lipídicas. Células MA104 crecidas en frascos de 75 cm² fueron infectadas y tratadas o no con jasplakinólido. Posteriormente se despegaron con EDTA, se centrifugaron y lavaron dos veces con PBS y se llevaron a un tubo Eppendorf en hielo. Los pasos siguientes se efectuaron en un cuarto frío (4°C). El botón celular se lisó por 20 min en 200 µl de TNC con 1% de Tritón X-100 (v/v). Posteriormente lo lisado se mezcló con iodixanol y se llevó a una concentración final de 40% de iodixanol y se preparó un gradiente de iodixanol discontinuo, como se describió previamente, con las siguientes características: 600 µl de la muestra en iodixanol 40% se colocaron en el fondo de un tubo para ultracentrífuga, seguido de 900 µl de iodixanol 35%, 900 µl de iodixanol 30%, 900 µl de iodixanol 25% y 900 µl de iodixanol 20%, aforándose a 5 ml finales con TNC. Los gradientes se centrifugaron a 200 000 x g por 4 h a 4°C y posteriormente se colectaron fracciones de 450 µl para su posterior procesamiento.

Microscopía Electrónica de Transmisión. Los análisis de microscopía electrónica se realizaron en la unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Biotecnología de la UNAM por la Dra. Guadalupe Zavala y también en colaboración con la Dra. Catherine Eichwald del Instituto de Virología de la

Universidad de Zurich, Suiza. Para ello células MA104 se crecieron en frascos de 75cm² y se infectaron con la cepa RRV a una MOI de 3. A 10 hpi se recolectaron los sobrenadantes celulares y se fraccionaron por medio de un gradiente de densidad (descrito con anterioridad). De algunas fracciones se tomó una muestra y se tiñeron con acetato de uranilo (3%) en 70% de metanol, analizándose cada muestra por medio de un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 900 (Gatan, Inc., Pleasanton, California, USA).

RESULTADOS

Efecto de fármacos que alteran al citoesqueleto de actina en el rendimiento viral

Para conocer si el ciclo de replicación de rotavirus requiere la participación del citoesqueleto de actina se utilizaron tres fármacos que alteran su organización: latrunculina B y citocalasina D (los cuales favorecen la despolimerización de la F-actina) y jasplakinólido (el cual induce y estabiliza al filamento de actina). Se determinó su toxicidad sobre monocapas de células MA104 observando el efecto citopático de los mismos a diferentes concentraciones, utilizando microscopía de contraste de fases (datos no mostrados). Posteriormente, se añadió cada fármaco a la concentración mayor en la que no se observó efecto citopático, a diferentes tiempos post infección (0, 4 y 8 h) a células MA104 infectadas con la cepa RRV (MOI de 3). El rendimiento viral se calculó en los lisados totales de células infectadas (células + medio de cultivo) a las 14 hpi, y por otro lado se cuantificó la salida del virus, a través de determinar el virus presente únicamente en el medio extracelular, definido en este trabajo como sobrenadante. Ni citocalasina D (10 mM) ni latrunculina B (1 μ M) afectaron significativamente la producción de progenie viral total ni la salida del virus de la célula (Figuras 9 y 10). Por otro lado, el jasplakinólido (1 μ M) pareció interferir con la salida de RRV de las células infectadas, pero no en la formación de las partículas infecciosas (Figura 9).

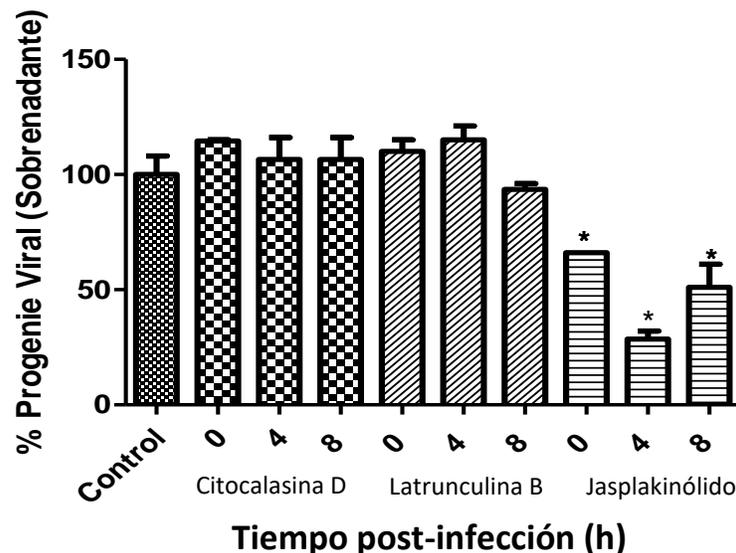


Figura 9. Efecto de la citocalasina D, latrunculina B y jasplakinólido sobre la salida de RRV de células MA104. Cada fármaco fue agregado a las células a diferentes tiempos (0, 4 y 8 hpi) y en todos estos casos las células se incubaron a 37°C hasta las 14 hpi. A este tiempo se colectó el sobrenadante de las células y el virus presente se tituló por un ensayo de inmunoperoxidasa, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3). Los datos se expresan como porcentaje de virus en sobrenadante respecto al control (células sin fármaco), que fue tomado como el 100% y se analizaron por medio de GraphPad Prism por una prueba de Tukey; * p<0.01, ** p<0.05.

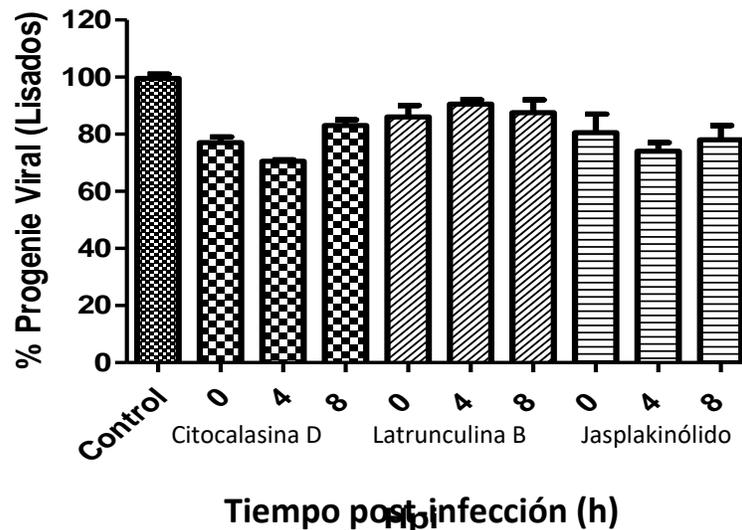


Figura 10. Efecto de la citocalasina D, latrunculina B y jasplakinólido sobre la producción total de virus. Cada fármaco se agregó a las células a diferentes tiempos (0, 4 y 8 hpi). A las 14 hpi a 37°C en cada caso, se colectaron las células junto con el sobrenadante y se lisaron por varios ciclos de congelación-descongelación. Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3). Los datos son expresados como porcentaje de rendimiento viral respecto al control (células sin fármaco).

Dado que nuestros resultados sugirieron que el jasplakinólido tiene efecto sobre la salida del virus de las células, se procedió a realizar pruebas con nuevas ventanas de tiempo con este fármaco. Los resultados confirmaron que jasplakinólido inhibe la salida de RRV en células MA104, con un efecto mayor al agregar la droga a 4 hpi (Figura 11), sin embargo, al determinar el virus presente en lisados totales se confirmó también que esta droga no afecta la formación de las partículas infecciosas (Figura 12). Como se observó que existía un efecto mayor si se añadía el fármaco a 4 hpi se decidió trabajar a estos tiempos en los ensayos posteriores.

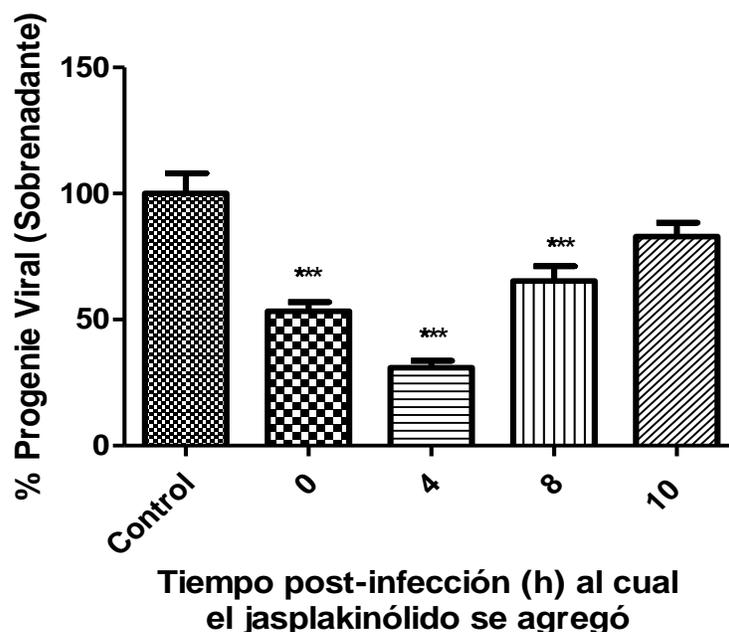


Figura 11. Jasplakinólido inhibe la salida de RRV en células MA104. El fármaco se añadió a diferentes tiempos post-infección (0, 4, 8 y 10 hpi). Después de 14 h de infección a 37°C, se colectó el sobrenadante y se cuantificó mediante un ensayo de inmunoperoxidasa. Las barras representan el error estándar de la media de cuatro ensayos independientes (n=4) Los datos son expresados como porcentaje de virus en sobrenadante respecto al control (células sin fármaco) que fue tomado como el 100% y se analizaron por medio de GraphPad Prism por una prueba de Tukey; *** p<0.001.

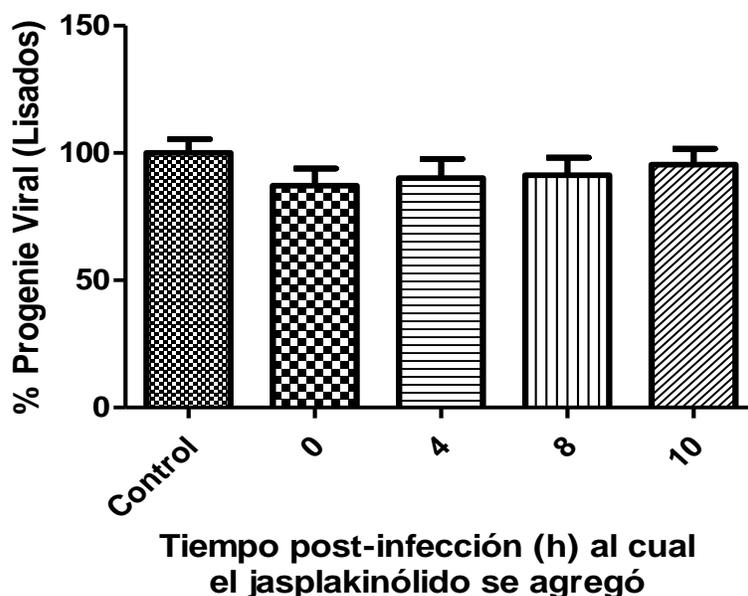


Figura 12. Jasplakinólido no afecta la formación de partículas infecciosas de RRV. El fármaco se añadió a diferentes tiempos post-infección (0, 4, 8 y 10 hpi). Después de 14 h de infección a 37°C, se colectaron las células junto con el sobrenadante y se lisaron por varios ciclos de congelación-descongelación y se cuantificó el virus presente en el lisado. Las barras representan el error estándar de la media de cuatro ensayos independientes (n=4). Los datos son expresados como porcentaje de rendimiento viral respecto al control (células sin fármaco) que fue tomado como el 100%.

Efecto del jasplakinólido sobre la organización del citoesqueleto de actina en células MA104

Para observar el efecto del jasplakinólido sobre el citoesqueleto de actina durante diferentes tiempos de acción, células MA104 se trataron con jasplakinólido (1 μ M) a diferentes tiempos y se tiñeron con faloidina fluorescente para observar al citoesqueleto de actina. Las células control muestran una red de actina cortical que permite observar el contorno de cada célula, además de presentar una red de haces de filamentos en el citoplasma celular (Figura 13A). En las células tratadas con el fármaco se observaron alteraciones morfológicas en el citoesqueleto, principalmente en la red de actina citoplasmática, la cual tiende a desaparecer conforme avanza el tiempo (a las 10 y 14 h después de agregar jasplakinólido).

También se puede observar lo que parecieran ser agregados de actina en el citoplasma a tiempos largos de exposición con el fármaco (Figura 13D), sin embargo la actina cortical parece no afectarse en presencia del jasplakinólido.

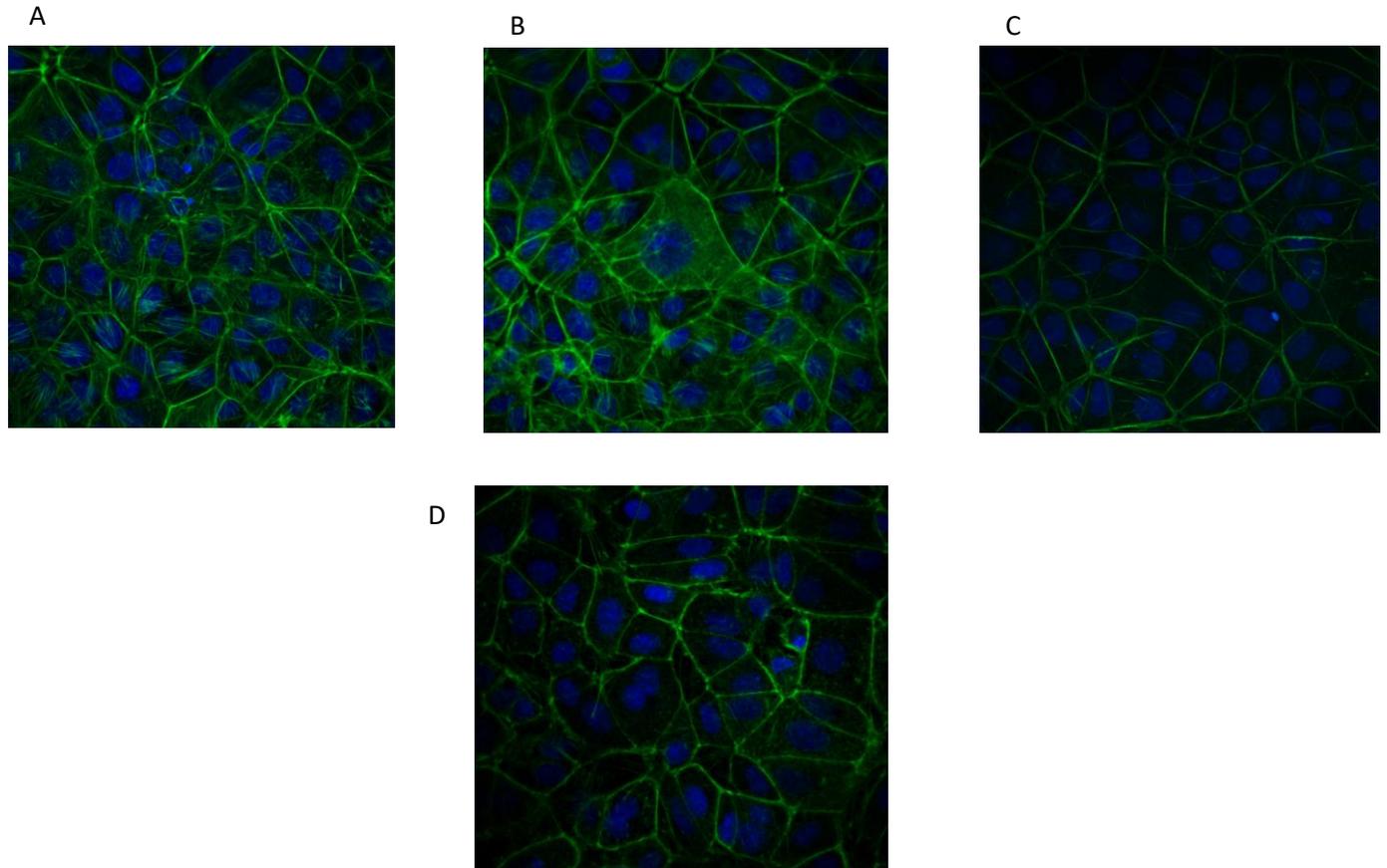


Figura 13. Efecto del jasplakinólido sobre células MA104 a diferentes tiempos.

Células MA104 fueron o no tratadas con jasplakinólido ($1\mu\text{M}$) a diferentes tiempos: A) Células control; B) 6 h con jasplakinólido; C) 10 h con jasplakinólido; D) 14 h con jasplakinólido. Todas las células fueron incubadas con o sin fármaco a 37°C y fueron fijadas y teñidas como se describió previamente en Materiales y Métodos. En azul (DAPI) se muestran los núcleos, mientras que la actina se tiñó con faloidina acoplada a Alexa-488 (verde).

Cinética de producción y liberación de virus

Se ha reportado que la formación de nuevas partículas virales comienza a las 4 hpi, y la mayor parte se encuentra ensamblada a las 8 hpi (Martínez, 2015), sin

embargo desconocíamos los tiempos post-infección a los cuales el virus comienza a salir de las células y si el jasplakinólido inhibe diferencialmente esta liberación a diferentes tiempos. Para determinar esto, células MA104 se infectaron con la cepa RRV y se les añadió o no el jasplakinólido a 4 hpi, cuantificándose la cantidad de virus dentro y fuera de las células a diferentes tiempos. Como se puede observar en la figura 14, la liberación del virus de las células empieza a partir de las 10 hpi, teniendo un pico máximo a las 14 hpi, y en todo este lapso de tiempo se observó una menor cantidad de virus en el sobrenadante en células tratadas con el fármaco respecto al control. A tiempos tardíos de infección (≥ 16 hpi), la cantidad de virus en el sobrenadante disminuye, debido probablemente a que éstos se unen a la superficie de otras células para iniciar un nuevo ciclo. La cantidad de virus total (virus dentro y fuera de las células) se incrementa a partir de las 4 hpi, hasta llegar a un máximo a las 14 hpi. Sin embargo, no se observó diferencia en la cantidad de virus total en células tratadas con jasplakinólido respecto a las no tratadas a lo largo de toda la infección (Figura 15).

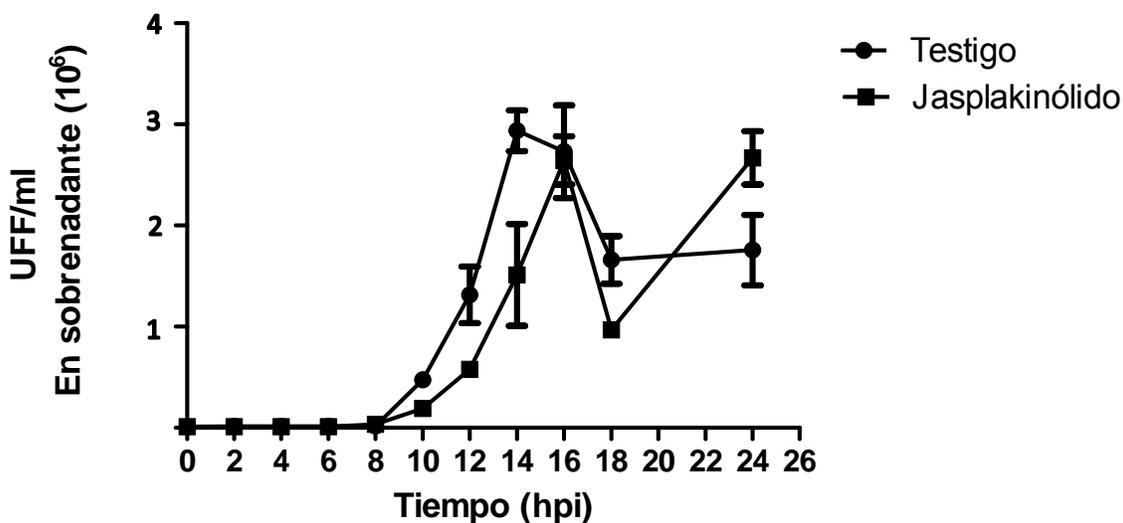


Figura 14. Cinética de liberación de la cepa RRV. Células MA104 fueron infectadas con la cepa RRV (MOI=3) y se incubaron a 37°C. A 4 hpi se añadió el jasplakinólido (1 μ M) y se mantuvo así por el resto de la infección. La cuantificación se realizó tomando únicamente los sobrenadantes. Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3).

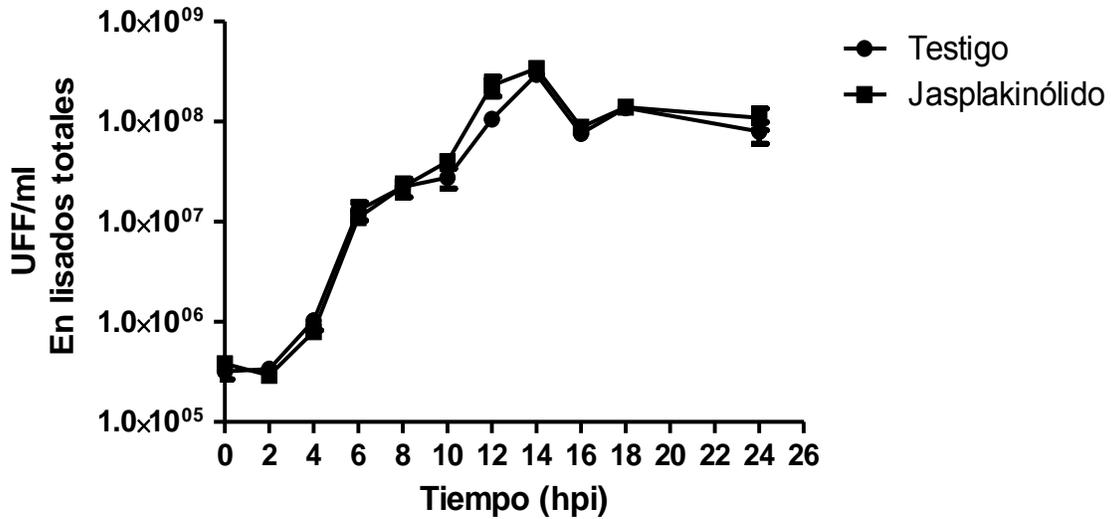


Figura 15. Cinética de producción de virus infeccioso de la cepa RRV. Células MA104 fueron infectadas con la cepa RRV (MOI=3) y se incubaron a 37°C. A 4 hpi se añadió el jasplakinólido (1µM) y se mantuvo así por el resto de la infección. La cuantificación se realizó colectando las células junto con el sobrenadante y lisándolas por congelación. Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3).

Antes de las 8 hpi no se observó la presencia de virus en el sobrenadante, sin embargo el virus liberado se puede detectar a partir de las 9 hpi. A partir de este tiempo hasta las 14 hpi la presencia del fármaco inhibió la salida de rotavirus en un 60% aproximadamente (Figura 16).

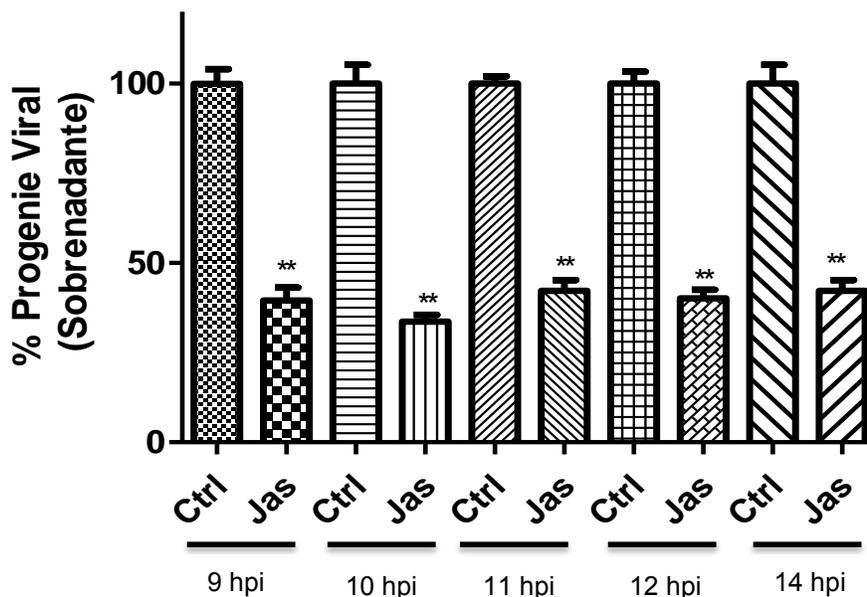
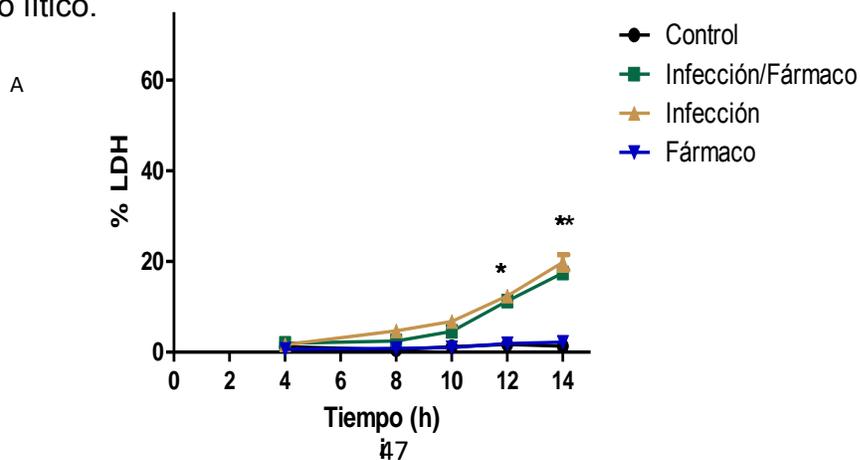


Figura 16. La salida de rotavirus es inhibida por jasplakinólido. Células MA104 fueron infectadas con la cepa RRV y se incubaron a 37°C. A 4 hpi se añadió el jasplakinólido (Jas, 1 μ M) y se mantuvo así hasta cada tiempo respectivo para su respectiva cuantificación. Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3). Los datos son expresados como porcentaje de virus en sobrenadante respecto al control (Ctrl, células sin fármaco) que fue tomado como el 100% y se analizaron por medio de GraphPad Prism por una prueba de Tukey; ** p<0.001.

La infección con rotavirus no compromete la viabilidad celular a tiempos en los que inicia su salida de células infectadas

Tradicionalmente, se ha asumido que rotavirus es liberado de células MA104 por lisis celular (Altenburg *et al.*, 1980), sin embargo en nuestras condiciones de trabajo esta liberación es inhibida por el jasplakinólido, lo cual sugiere que podría existir otro mecanismo por medio del cual rotavirus sale de estas células no polarizadas.

Para determinar si la infección con rotavirus y/o el tratamiento con jasplakinólido causan daño celular, y en caso afirmativo, a qué tiempos lo ocasionan, se midió la viabilidad de las células MA104 por dos métodos: liberación de lactato deshidrogenasa y reducción de rezarsurina. El primer método nos permitió evaluar indirectamente la integridad de la membrana celular, mientras que el segundo nos dio indicios de la viabilidad celular por medio de su actividad metabólica. Los resultados muestran que este fármaco no daña a las células MA104 a tiempos menores a 12 hpi (Figura 17). Estos resultados sugieren que, al menos a tiempos tempranos de la infección (<12 hpi), el virus sale de las células MA104 por un mecanismo no lítico.



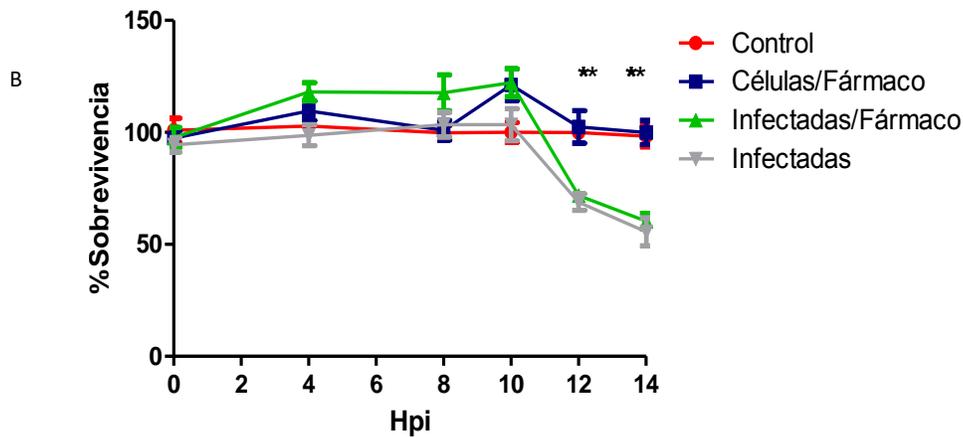


Figura 17. La salida de rotavirus de las células inicia cuando aún no se presenta daño celular. Células MA104 se infectaron a una MOI de 3 y se incubaron el tiempo indicado a 37°C, añadiéndose el fármaco a 4 hpi. Después del tiempo de incubación respectivo se colectó el medio celular y la liberación de LDH fue determinada (A) o la reducción de rezarsurina fue medida (B). Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3). Los datos son expresados como cantidad de LDH liberada al medio (A) o porcentaje de sobrevivencia celular respecto al control que fue tomado como 100% (B). Los datos se analizaron por medio de GraphPad Prism por una prueba de Tukey; **, * p<0.01

Parte de las partículas virales extracelulares se encuentran asociadas a estructuras lipídicas de baja densidad

La observación de que el fármaco inhibe la salida del virus sin afectar la viabilidad celular, sugiere que existe un mecanismo no lítico por el cual el virus comienza a liberarse de las células a partir de las 9 hpi. Para caracterizar las partículas virales que se liberan a tiempos tempranos examinamos la hipótesis de que el virus extracelular pudiera salir asociado a vesículas y por lo mismo pudiera encontrarse asociado a estructuras membranosas de la célula. Este tipo de egreso viral asociado a vesículas se ha reportado previamente para diferentes virus, algunos de ellos no envueltos, como poliovirus (Feng *et al.*, 2013).

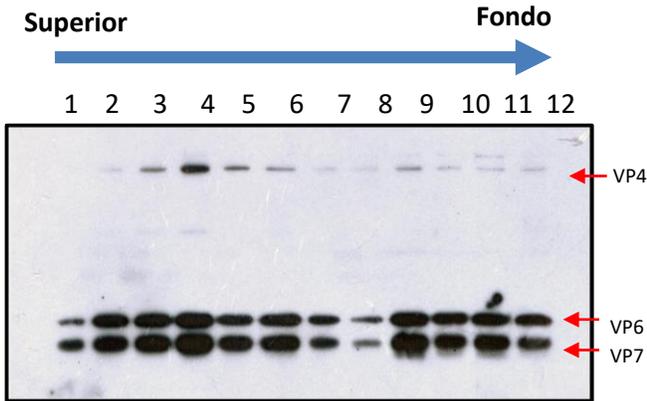
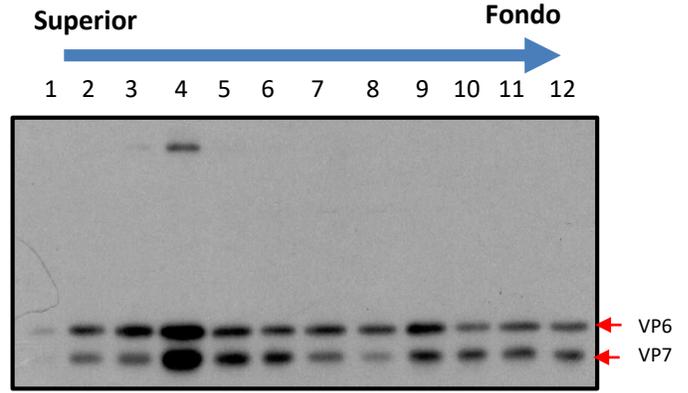
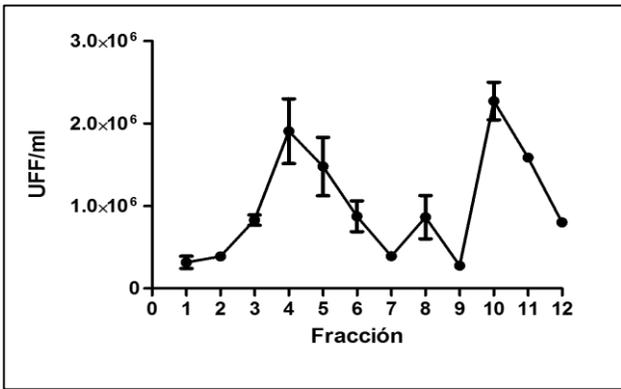
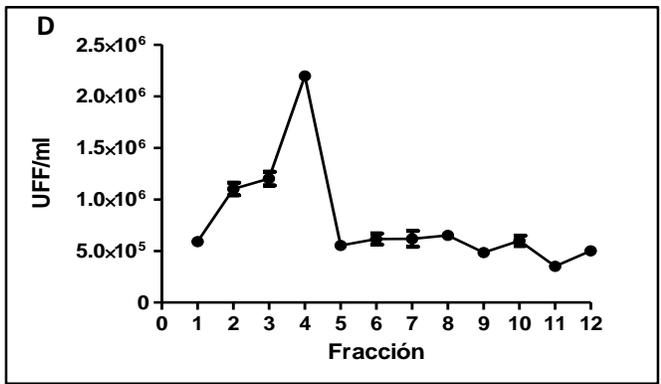
Para analizar la interacción rotavirus-membranas en el medio extracelular utilizamos un gradiente de flotación en iodixanol, el cual permite separar proteínas solubles de estructuras asociadas a membranas lipídicas con base en su densidad, ya que estas últimas flotan después de ultracentrifugarse en este tipo de gradiente (Xia *et al.*, 1998). En este ensayo se utilizaron los virus presentes en el medio extracelular de células infectadas con RRV a las 10 hpi. También se analizó el virus en el sobrenadante de células Caco-2 infectadas con RRV a las 18 hpi. Estas últimas células se utilizaron porque se ha descrito que rotavirus sale por un mecanismo no lítico en esta línea celular (Delmas *et al.*, 2004b).

Los virus presentes en el sobrenadante de ambos tipos de células se fraccionaron en un gradiente de iodixanol (como se describe en Materiales y Métodos). Posteriormente cada fracción se analizó por Western blot, utilizando un anticuerpo contra TLPs, observándose que la proteínas virales se distribuyen a través de todo el gradiente (Figura 18A), lo cual sugiere que, al menos, una fracción de las partículas virales se encuentra asociada a estructuras lipídicas de baja densidad al salir de las células infectadas. Por otro lado, las células infectadas tratadas con jasplakinólido presentan un patrón similar de distribución de las proteínas virales (Figura 18B), indicándonos que el jasplakinólido no modifica la interacción entre las proteínas virales en el sobrenadante y las posibles membranas lipídicas asociadas a éstas. Sin embargo, pudimos observar, similar a resultados anteriores, que existe una menor cantidad de virus en el sobrenadante cuando las células son tratadas con jasplakinólido. De modo similar, en células Caco-2 se observó una distribución del virus a través de todo el gradiente (Figura 18E), y tampoco observaron diferencias en células tratadas o no con el fármaco (Figura 18F).

Para evaluar si las proteínas virales detectadas por Western blot en las diferentes fracciones del gradiente están formando partículas, y si éstas son infecciosas, determinamos la presencia de virus infeccioso en cada fracción. En los sobrenadantes de células MA104 (Figura 18C) observamos que sí hay virus infeccioso en el sobrenadante asociado a membranas celulares a 10 hpi, con un pico en la fracción 4. La misma observación se hizo en células tratadas con el

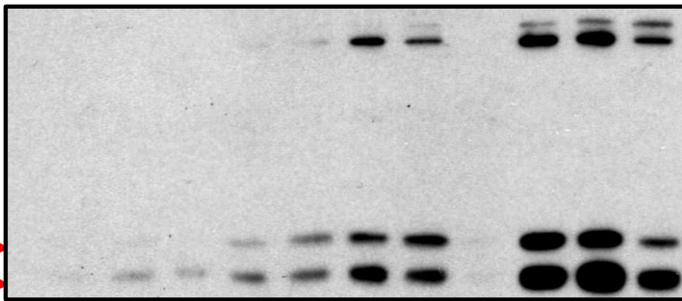
fármaco (Figura 18D). Observaciones similares se hicieron en células Caco-2 tratadas o no con jasplakinólido (Figuras 18G y H), aunque la cantidad de virus asociado a membranas parece menor. Sin embargo, la proporción de virus aparentemente asociado a membranas celulares fue variable entre diferentes experimentos, por lo que no se puede asegurar que en Caco-2 haya menos virus extracelular en estructuras membranosas.

Para confirmar que la partícula viral realmente esté asociada a estructuras lipídicas y no flote por sí misma en este tipo de gradiente, se analizó la distribución de TLPs purificadas en gradiente de iodixanol. Las TLPs se colocaron en el fondo del tubo, se centrifugaron y se fraccionó el gradiente como se describió anteriormente. De modo paralelo, y como un control adicional, se trabajaron muestras de sobrenadantes de células infectadas, como se describió en el experimento anterior, pero una parte de estas muestras fue tratada, previo a la centrifugación, con el detergente Tritón X-100 (1%) y posteriormente se procedió con el fraccionamiento. Los resultados muestran que la partícula viral purificada no se encuentra en las primeras cuatro fracciones, a las cuales encontramos asociado el virus extracelular tanto en células MA104 como en Caco-2, y que la mayor parte del virus infeccioso se encuentra en el fondo del gradiente (Figura 19C). De modo similar, en las partículas virales extracelulares tratadas con el detergente no pudimos hallar virus en las primeras cuatro fracciones, contrario a lo visto en virus sin tratamiento alguno (Figura 19A y 19B), lo cual sugiere fuertemente que el virus liberado de las células está asociado a estructuras lipídicas de baja densidad. Los presentes datos nos indican que rotavirus se asocia a estructuras lipídicas al salir de células infectadas y que jasplakinólido inhibe esta salida pero no afecta la interacción membrana-virus.

A**B****C****D**

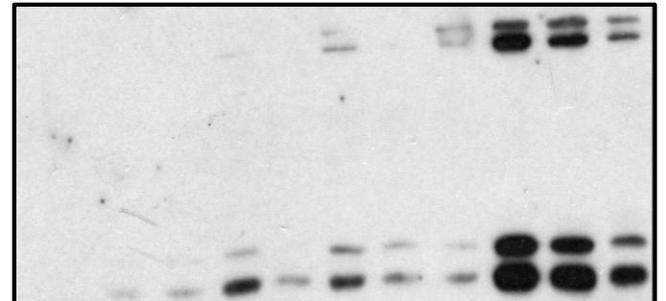
E Superior Fondo

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



F Superior Fondo

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



VP6
VP7

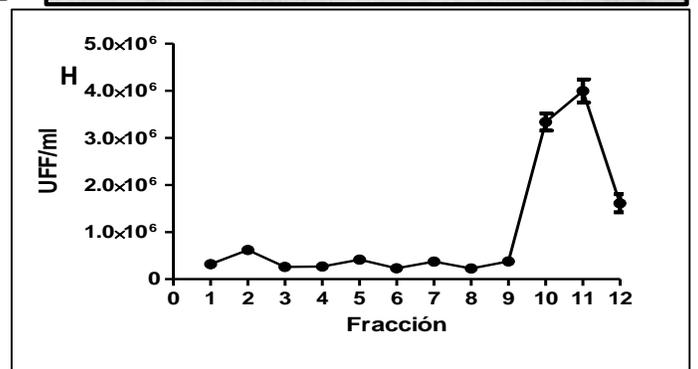
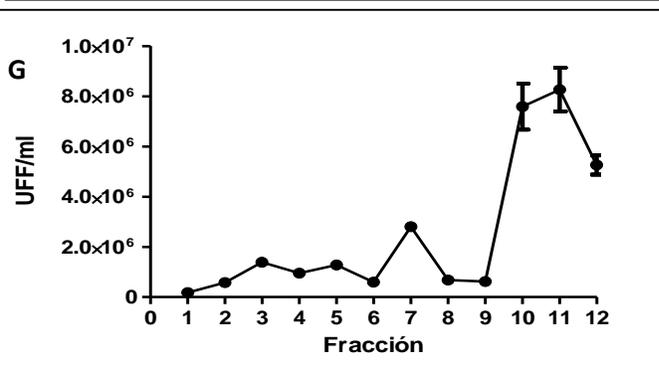


Figura 18. Rotavirus está asociado a estructuras de baja densidad en el sobrenadante celular. Células MA104 (A, B, C y D) y células CaCo-2 (E, F, G y H) fueron infectadas con la cepa RRV e incubadas a 37°C. En el caso de las células tratadas con jasplakinólido, éste se agregó a las 4 hpi. A 10 hpi, en el caso de células MA104, y a 18 hpi, en el caso de CaCo-2, se recolectaron los sobrenadantes y fueron fraccionados por ultracentrifugación en un gradiente de densidad con iodixanol. Doce fracciones fueron colectadas y analizadas por Western blot con anticuerpos anti-TLPs, ya sea en las fracciones sin fármaco (A y E) o con fármaco (B y F). De igual manera, se evaluó la presencia de virus infeccioso para cada fracción en células tratadas (D y H) y no tratadas (C y G) con el fármaco. La fracción 1 corresponde a la parte superior del gradiente mientras que la 12 al fondo del mismo.

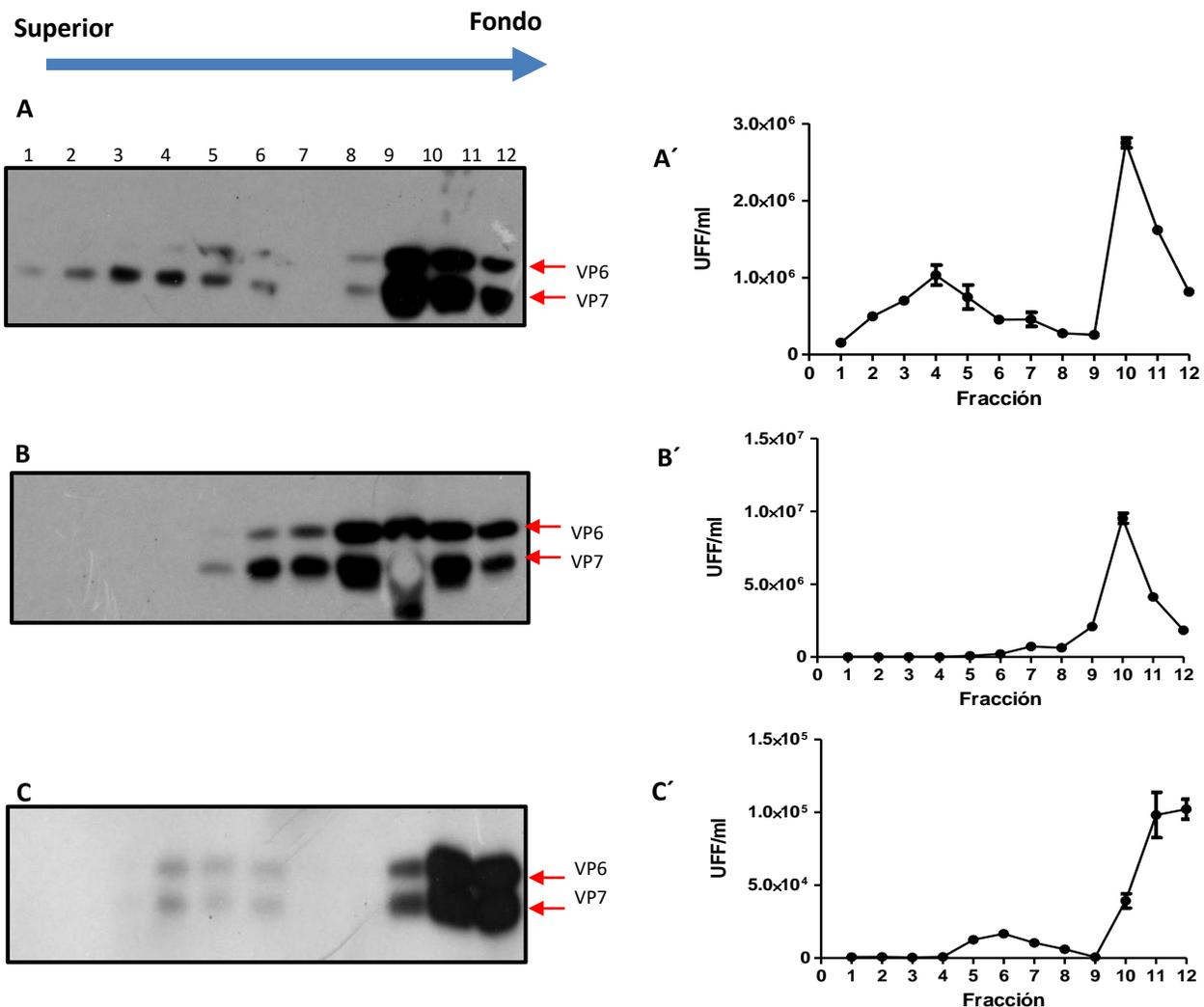
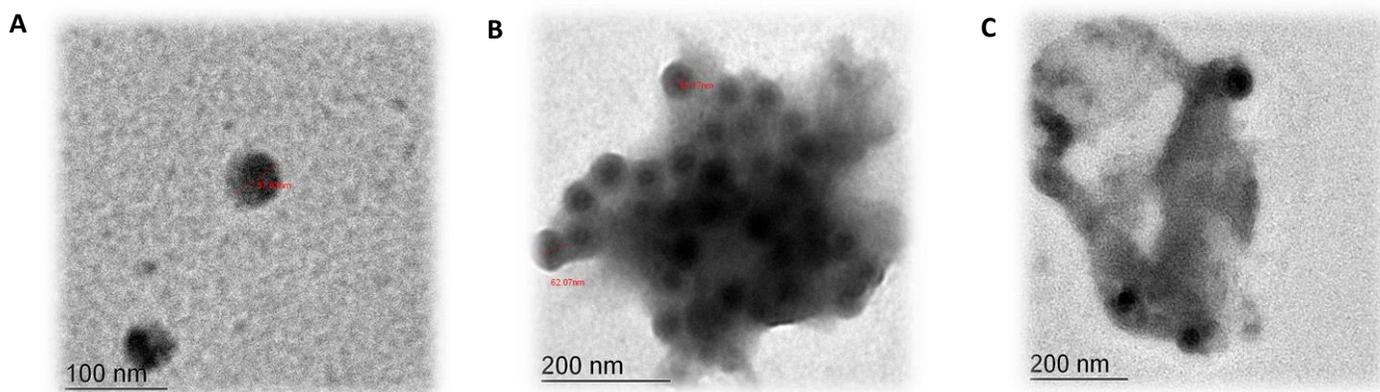


Figura 19. Partículas virales purificadas no flotan en el gradiente de densidad y el tratamiento de virus extracelular con detergente previene la flotación del virus. Células MA104 fueron infectadas con la cepa RRV e incubadas a 37°C. A 10 hpi se recolectaron los sobrenadantes y se trataron o no con Tritón X-100 (1%) por 30 min a temperatura ambiente, posteriormente fueron fraccionados por ultracentrifugación en un gradiente de densidad de iodixanol. Doce fracciones fueron colectadas y analizadas por Western blot con anticuerpos anti-TLPs, en las fracciones de células infectadas no tratadas (A) o tratadas con el detergente (B); de igual manera se evaluó la presencia de virus infeccioso para cada fracción en células tratadas (A') y no tratadas (B'). Por otro lado, TLPs purificadas se fraccionaron por ultracentrifugación en un gradiente de densidad y se evaluó la presencia del virus en cada fracción como se mencionó anteriormente (C y C'). La fracción 1 corresponde a la parte superior del gradiente mientras que las 12 es el fondo del mismo.

El virus que sugerimos que está asociado a estructuras lipídicas se analizó por microscopía electrónica. Para esto, observamos una muestra proveniente de la fracción cuatro del gradiente de densidad obtenido a partir de virus extracelular de células MA104 infectadas. Se eligió esta fracción porque mostraba un enriquecimiento mayor del virus en comparación a las otras fracciones flotantes (1-3) (Figura 18A). En las imágenes obtenidas no se logró observar con claridad virus envueltos o vinculados a vesículas, sin embargo se pudo visualizar virus asociado a lo que parecieran ser estructuras membranosas, además de virus libre no asociado (Figura 20).



D

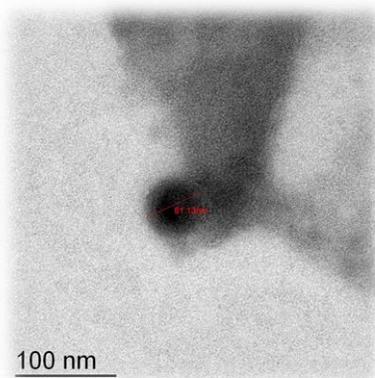


Figura 20. Imágenes de microscopía electrónica de virus extracelular asociado a estructuras membranosas de baja densidad. A partir de la fracción cuatro del gradiente de densidad de iodixanol proveniente de virus extracelular de células MA104 infectadas con la cepa RRV se tomó una muestra para su visualización por medio de microscopía electrónica. A, virus libre presente en la muestra; B, C, D, virus aparentemente asociado a estructuras membranosas.

Análisis por microscopía electrónica de células MA104 tratadas con jasplakinólido e infectadas con RRV

Para extender la caracterización del efecto del fármaco sobre la salida del virus, analizamos por microscopía electrónica células infectadas con RRV, a 10 hpi, con el objetivo de explorar la posibilidad de encontrar alteraciones o modificaciones en la distribución intracelular y asociación con membranas de los virus ensamblados en presencia de jasplakinólido. Este análisis lo llevamos a cabo en colaboración de la Dr. Catherine Eichwald, del Instituto de Virología de la Universidad de Zúrich, Suiza. Células MA104 tratadas o no con el fármaco se infectaron con RRV (MOI=250) y se fijaron a las 10 hpi. La figura 21 muestra células control, no infectadas ni tratadas con fármaco (NI). En ellas se puede distinguir con claridad algunos organelos celulares como mitocondrias, microtúbulos, el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi. En las células tratadas con jasplakinólido (NI + 100 μ M) se observan células bajo estrés con abundancia de mitocondrias y autofagosomas, y no es posible distinguir filamentos de actina ni microtúbulos. En

la parte inferior de la figura se encuentran las células infectadas tratadas y no tratadas con jasplakinólido (RRV y RRV + 100 μ M), en ambos casos se observan con claridad los viroplasmos y las partículas virales en proceso de gemación del viroplasma hacia el RE y aquellas que han recientemente gemado, las cuales están envueltas en una capa de lípidos, así como TLPs, en el interior del RE, que ya han perdido la capa lipídica. En el caso de las células infectadas y tratadas con el fármaco no se pueden visualizar filamentos de actina ni microtúbulos (similar a su respectivo control). No pudimos observar diferencias claras respecto a células infectadas control o tratadas con jasplakinólido, sin embargo, se pudieron visualizar lo que pareciera ser estructuras lipídicas con virus en su interior, cercanas a la membrana plasmática (B). De modo similar estas estructuras se pudieron observar en células infectadas no tratadas (C), lo que pudieran ser fragmentos del retículo endoplásmico (caracterizado por la presencia de ribosomas) con virus en su interior, muy próximos a la membrana plasmática y lejanos a los viroplasmos. Estas estructuras pudieran fungir como el medio de liberación del virus, sin embargo aún es necesario realizar más estudios al respecto para corroborarlo.

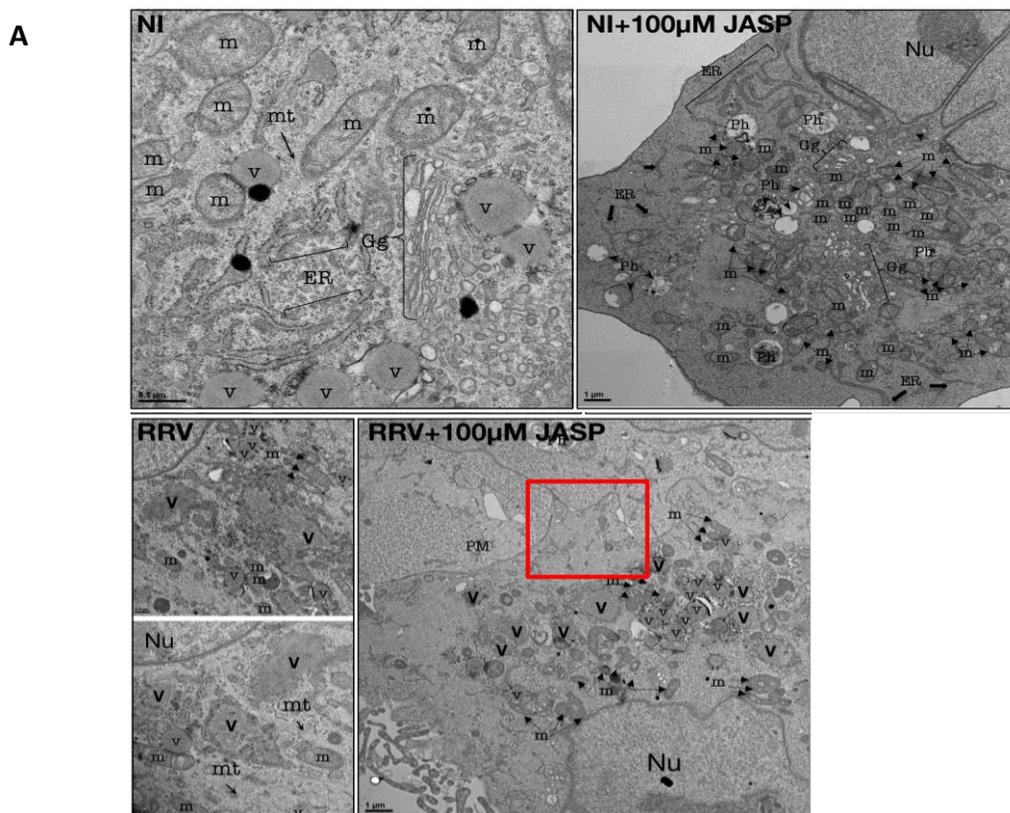
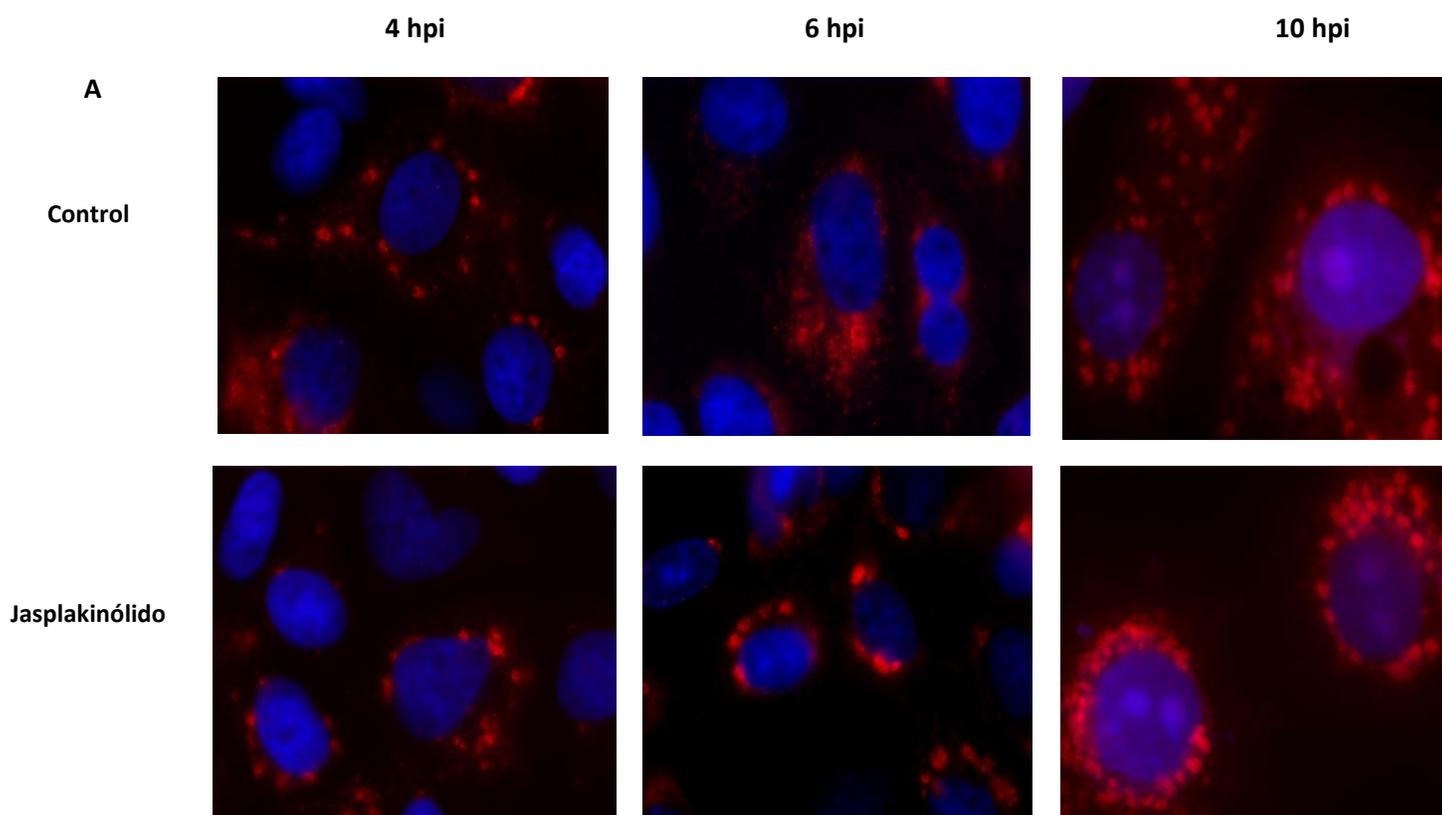


Figura 21. Microscopía electrónica de células MA104 infectadas con RRV en presencia o ausencia de jasplakinólido. A las 6 hpi las células se trataron con jasplakinólido (100 μ M) y a las 10 hpi se fijaron con glutaraldehído (2.5%) y se procesaron para microscopía electrónica. A) cuadrante superior izquierdo, células control (NI); cuadrante superior derecho, células tratadas con jasplakinólido (NI + 100 μ M); cuadrantes inferior izquierdo, células infectadas no tratadas (RRV); cuadrante inferior derecho, células infectadas y tratadas con el fármaco (RRV + 100 μ M). En el recuadro rojo se observa virus dentro de estructuras con membrana cercanas a la membrana plasmática (ampliado y señalado con una flecha roja en B). C) células infectadas con RRV donde se puede observar en el cuadrante superior izquierdo fragmentos del retículo endoplásmico conteniendo en su interior partículas virales (recuadro blanco) próximas a la membrana plasmática y lejanas de los viroplasma (su ampliación en el cuadrante superior derecho); cuadrante inferior izquierdo, visualización de estas estructuras membranosas con virus en su interior en otras zonas de la célula infectada, indicando que no son casos aislados; cuadrante inferior central e inferior derecho, viroplasma y partículas virales en proceso de gemación hacia el interior del retículo endoplásmico circundantes al mismo viroplasma. Nu, núcleo; Ph, fagosoma; m, mitocondria; Gg, aparato de Golgi; ER, retículo endoplásmico; mt, microtúbulos; PM, membrana plasmática; v, vacuola; V, viroplasma; flechas blancas, TLPs. Imágenes obtenidas por la Dr. Catherine Eichwald del Instituto de Virología de la Universidad de Zúrich, Suiza.

El jasplakinólido afecta la distribución intracelular de VP4

En células polarizadas Caco-2 se ha visto que VP4 se une a la red de actina cortical en la parte apical de las células, y que su movilidad intracelular depende del *treadmilling* de la actina (Gardet *et al.*, 2007). Con estos antecedentes decidimos evaluar si en nuestro sistema de células no polarizadas MA104 la localización intracelular de VP4 es dependiente de actina y ésta se afectaba en presencia del jasplakinólido. Para ello, células MA104 se infectaron con la cepa RRV a una MOI de 3 y a diferentes tiempos post-infección se fijaron y se visualizó la localización de VP4 por microscopía de inmunofluorescencia utilizando dos anticuerpos monoclonales, HS2 y 2G4, los cuales se unen a diferentes epítopes del dominio VP5 de la proteína VP4 (Zárate *et al.*, 2003). En las células control, VP4 tiende a tener una distribución heterogénea, con una parte cercana a viroplasma, como se ha reportado (González *et al.*, 2000), y otra más

uniformemente distribuida en el citoplasma celular (más evidente con el monoclonal 2G4), lo cual se observa desde las 4 hasta las 10 hpi (observado con los dos anticuerpos), sin embargo, cuando son tratadas con jasplakinólido, la localización de VP4 se restringe en mayor medida a la zona perinuclear, posiblemente localizada cerca de los viroplasmias (Figura 22).



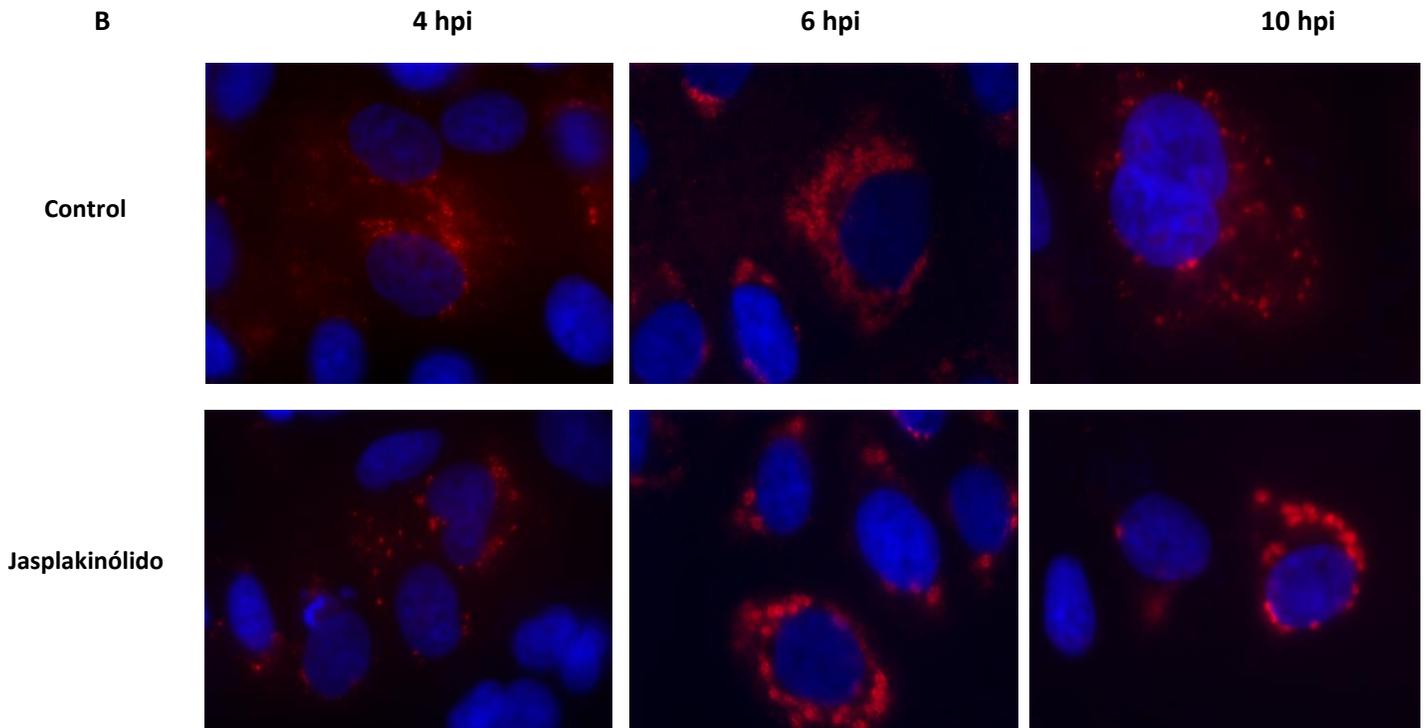


Figura 22. Jasplakinólido afecta la localización de la proteína VP4 en el citoplasma.

Células MA104 se infectaron con la cepa RRV a una MOI de 3. Posteriormente se añadió jasplakinólido (1 μ M) a diferentes tiempos, de acuerdo al tiempo de fijación de la monocapa celular: a 0 hpi, en el caso de las células fijadas a 4hpi y 6hpi; a 4 hpi en el caso de células fijadas a 10 hpi. A las células control no se les añadió el fármaco. En todos los casos las células se incubaron a 37°C hasta su procesamiento. Las células fueron fijadas y teñidas contra VP4 (color rojo) con los anticuerpos monoclonales HS2 (A) o 2G4 (B).

Estos resultados sugieren que la proteína VP4 es sintetizada y distribuida en el citoplasma de las células infectadas por medio del citoesqueleto de actina, sin embargo el fármaco inhibe dicha distribución, al tiempo que restringe su distribución a las zonas aledañas de los viroplasmos.

Nejmeddine y colaboradores (2000) reportaron previamente que una fracción de la proteína VP4 se encuentra expuesta en la superficie de la membrana plasmática en células MA104. Decidimos entonces evaluar si la presencia de VP4 en membrana plasmática se afecta por la acción del fármaco. Para ello, células MA104 fueron infectadas y a diferentes tiempos post-infección las proteínas en la superficie celular se marcaron por biotinylación. En este tipo de ensayo el agente biotinylante, Sulfo-NHS-Biotina (ThermoFisher Scientific) únicamente marca proteínas presentes en la membrana plasmática, ya que es impermeable a la membrana celular. Posteriormente, las células se lisaron y las proteínas biotinyladas fueron purificadas por perlas magnéticas de estreptavidina, y se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de PVDF (Fluoruro de polidivilino). Las membranas se incubaron secuencialmente con estreptavidina-peroxidasa y con un anticuerpo policlonal anti-TLPs para revelar la presencia de proteínas virales y su posible estado biotinylado. De modo paralelo, se analizaron con el mismo procedimiento proteínas obtenidas de células infectadas no biotinyladas, como control. Igualmente, se analizaron por Western blot lisados de células infectadas biotinyladas, aplicados directamente en el gel, esto es, sin purificar con las perlas magnéticas-estreptavidina, como control de síntesis de las diferentes proteínas virales estructurales.

Los resultados confirmaron que efectivamente VP4 se encuentra en membrana plasmática, ya que se logró biotinylar y purificar, a diferencia de las otras proteínas virales que se encuentran en citoplasma (Figura 23), en concordancia con los resultados de Nejmeddine y colaboradores (2000). En células tratadas con jasplakinólido no se observó una disminución en la producción de las proteínas virales, sin embargo la cantidad de VP4 presente en membrana plasmática disminuyó hasta en un 50% (analizado por densitometría, Figura 23C) y esto se mantuvo a las 6, 8 y 10 hpi. Estos resultados corroboran que jasplakinólido no afecta la formación de partículas virales, sin embargo altera la movilidad de VP4 hacia la membrana plasmática en un porcentaje similar a la inhibición observada respecto a la salida del virus.

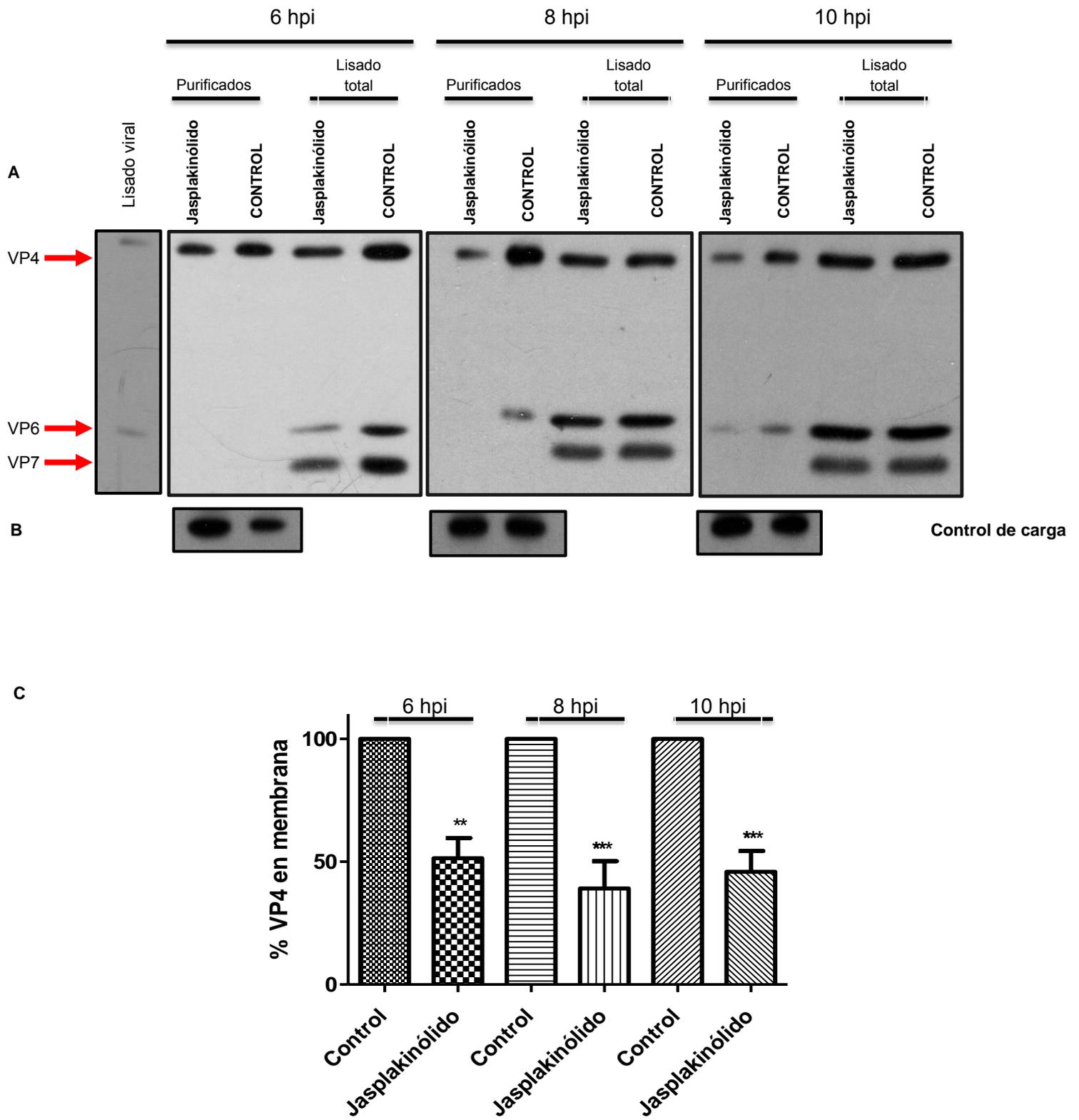


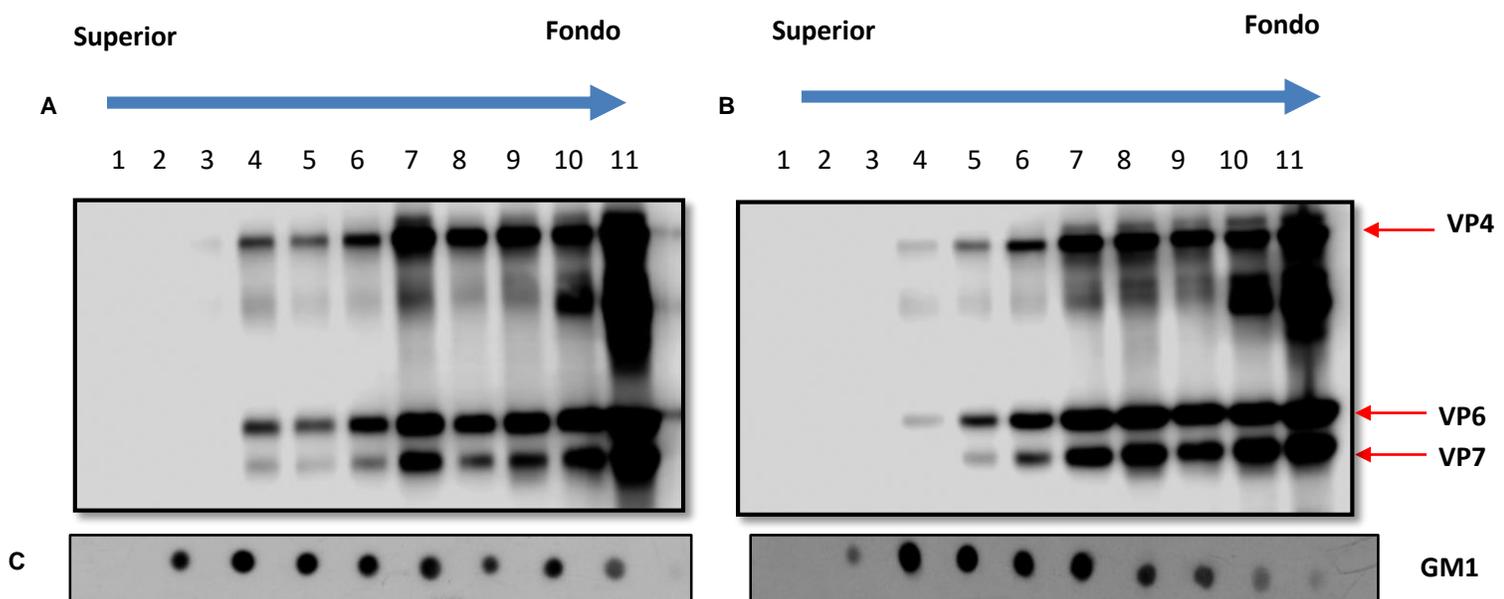
Figura 23. El jasplakinólido inhibe el transporte de VP4 hacia la membrana plasmática. Células MA104 se infectaron con la cepa RRV a una MOI de 3 y se trataron o

no con jasplakinólido (1 μ M) por 6 h, previo a la biotilación. Posteriormente las proteínas de membrana fueron biotiladas a diferentes tiempos post-infección, como se indica. Las células se lisaron y las proteínas biotiladas se purificaron por medio de perlas de estreptavidina y se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo contra TLPs, en el caso de las proteínas virales (A), o en el caso del control de carga, estreptavidina-peroxidasa (B). C, cuantificación por densitometría de la cantidad de VP4 en membrana celular de células infectadas y tratadas con jasplakinólido a diferentes tiempos post-infección respecto a células infectadas y no tratadas con el fármaco, que fue tomado como el 100%. Se muestra un Western blot representativo de al menos tres experimentos independientes. Como control de carga se tomó una proteína celular de membrana biotilada. Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3). Los datos se analizaron por medio de GraphPad Prism por una prueba de Tukey; ** p<0.01, *** p<0.001.

La asociación entre balsas lipídicas y rotavirus requiere del *treadmilling* del citoesqueleto de actina

Se ha reportado que en la infección con rotavirus las partículas virales son capaces de unirse a balsas lipídicas en células MA104, y que esta asociación depende en gran parte de VP4 (Cuadras *et al.*, 2006), por lo que en nuestro trabajo evaluamos si la asociación *rafts*-virus requiere de la movilidad de VP4 a través del citoesqueleto de actina. Las balsas lipídicas son microdominios de membrana resistentes a la extracción con detergentes no iónicos y flotan en un gradiente de densidad por ultracentrifugación, mientras que las proteínas celulares solubles se concentran en el fondo del gradiente (Brown y Rose, 1992). A través de un gradiente discontinuo de iodixanol purificamos las balsas lipídicas a partir de células MA104 infectadas con la cepa RRV (descrito en Materiales y Métodos). Se colectaron once fracciones del gradiente, y se caracterizaron las proteínas virales presentes en cada fracción por medio de Western blot, utilizando un anticuerpo contra TLPs. Para corroborar que efectivamente estábamos purificando balsas lipídicas se realizó un dot blot para detectar GM1, gangliósido que se considera un marcador típico de *rafts* (Dietrich *et al.*, 2001). Para su detección se utilizó a la subunidad B de la toxina de *Vibrio cholera* acoplada a peroxidasa. Como se puede ver en la figura 24, se obtuvo un mayor enriquecimiento de GM1 en la fracción

cuatro, la cual corresponde a una región de baja densidad en el gradiente, y al mismo tiempo en esa fracción se observó una cantidad importante de virus infeccioso, lo cual concuerda con lo reportado por Cuadras *et al.*, (2006) (Figura 24A y D). Lo interesante fue que en presencia del jasplakinólido la asociación de virus infeccioso a las balsas lipídicas se redujo (Figura 24D) en fracciones que flotan en el gradiente, y solo en las últimas fracciones del fondo del gradiente (correspondientes a proteínas solubles) la cantidad de virus infeccioso era similar en células infectadas tratadas y no tratadas con el fármaco. Por Western blot también se observó una reducción de proteínas virales, más evidente en las fracciones que flotan (Fig. 24B). Jasplakinólido no afectó la integridad de estos microdominios de membrana, ya que GM1 fue encontrada enriquecida en fracciones que flotan, ya sea en células tratadas y células no tratadas con el fármaco. La cuenta total de virus infeccioso en ambos casos fue muy similar (datos no mostrados), por lo que la disminución de la asociación entre *rafts* y virus no se debe a una menor producción de virus infeccioso. De acuerdo a lo reportado por Cuadras y colaboradores (2006), VP4 es importante para la asociación del virus con balsas lipídicas y nuestros resultados indican que se requiere de un adecuado funcionamiento del citoesqueleto de actina para que esta proteína estructural sea transportada a membrana, además de que pueda interactuar con las balsas lipídicas.



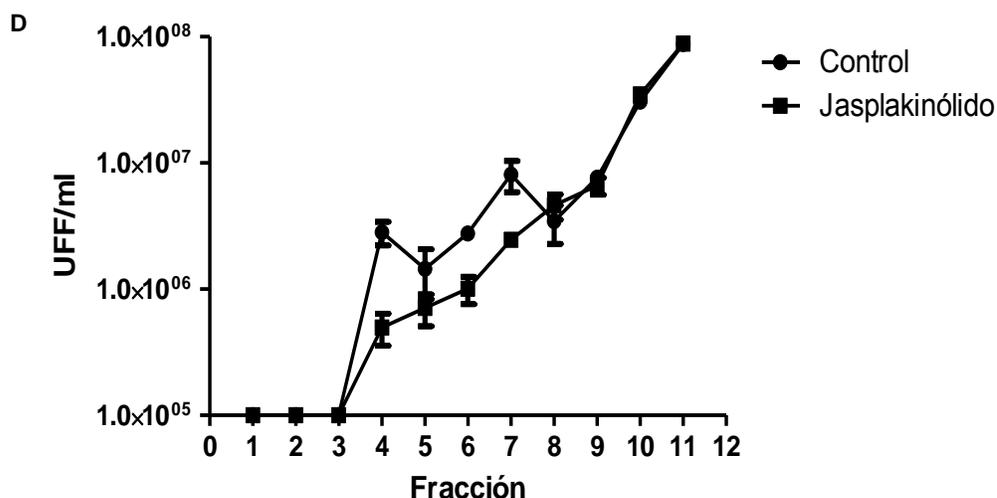


Figura 24. La asociación entre RRV y balsas lipídicas requiere del *treadmilling* del citoesqueleto de actina. Células MA104 se infectaron con la cepa RRV a una MOI de 3 y a las 4 hpi fueron tratadas (B) o no (A) con jasplakinólido (1 μ M), y se incubaron a 37°C hasta las 10 hpi, cuando fueron resuspendidas y se procedió a la extracción de *rafts*. Once fracciones se colectaron del gradiente y se analizaron por medio de Western blot utilizando un anticuerpo policlonal contra TLPs en el caso de las proteínas virales (A y B) o por dot blot en el caso del gangliósido GM1 (C) utilizando a la subunidad B de la toxina colérica acoplada a peroxidasa. Para cada fracción se cuantificó el virus infeccioso a través de un ensayo de inmunoperoxidasa (D). Se muestra un Western blot representativo de al menos tres experimentos independientes. Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3).

La proteína VP4 presente en membrana plasmática se incorpora a partículas infecciosas.

Nuestros resultados muestran que VP4 requiere del citoesqueleto de actina para que el virus se asocie a balsas lipídicas y para que la proteína viral se traslade a la membrana plasmática, sin embargo, no se sabe si la VP4 asociada a membrana es capaz de ensamblarse en viriones maduros. Por tanto, en un siguiente paso, evaluamos si la VP4 hallada en membrana plasmática se ensambla en TLPs. Para esto, se infectaron células MA104 y a 6 hpi se biotinilaron las proteínas presentes en membrana plasmática por 30 min, posteriormente se lavaron las células y se saturó el exceso del agente biotinilante con glicina 100 mM, se lavó y se dejó con

MEM sin suero incubándose las células a 37°C hasta las 12 hpi. A este tiempo las células se lisaron por tres ciclos de congelación/descongelación y las TLPs se purificaron en gradientes isopícnicos de CsCl (Mason *et al.*, 1980). Posteriormente, las TLPs se incubaron con perlas magnéticas unidas a estreptavidina (descrito con anterioridad) para purificar las partículas biotiniladas, en caso de que la VP4 presente en membrana (previamente biotinilada) haya sido incorporada a la partícula de triple capa. Las TLPs purificadas de células infectadas biotiniladas y no biotiniladas se analizaron por Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal contra TLPs y con estreptavidina acoplada a peroxidasa. A pesar de que se utilizaron TLPs purificadas por CsCl, el revelado con estreptavidina peroxidasa mostró muchas bandas inespecíficas de proteínas biotiniladas y probablemente a VP4, deducido por su peso molecular y por nuestras observaciones previas. Sin embargo, la purificación de TLPs utilizando perlas de estreptavidina nos corroboró de manera indirecta que efectivamente la TLPs habían incorporado a la VP4 biotinilada, ya que logramos enriquecer a estas TLPs utilizando estas perlas (Figura 25). La especificidad de este ensayo se comprobó utilizando como control TLPs preparadas de la misma manera, obtenidas de células que no se habían biotinilado.

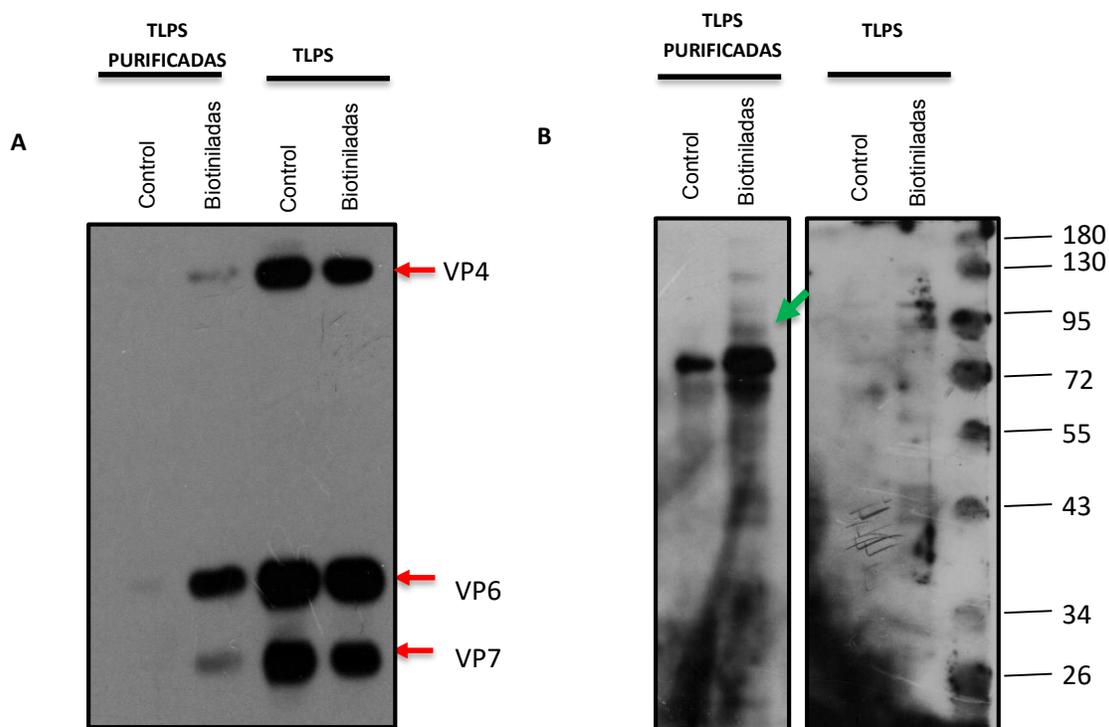


Figura 25. La VP4 localizada en membrana plasmática es incorporada a partículas infecciosas. Células MA104 se infectaron con la cepa RRV a una MOI de 3 y a las 6 hpi se biotinilaron (o no, como control) las proteínas de membrana por 30 min. Posteriormente las células se lavaron e incubaron a 37°C hasta las 12 hpi. A este tiempo las células fueron lisadas por tres ciclos de congelación/descongelación y se purificaron las TLPs por medio de un gradiente de CsCl. Las TLPs obtenidas a partir de células infectadas biotiniladas y no biotiniladas (control) se incubaron con perlas magnéticas de estreptavidina (TLPs purificadas) y después se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo policlonal contra TLPs (A) o con estreptavidina acoplada a peroxidasa (B). Flecha verde, banda que pudiera corresponder a VP4 biotinilada (peso molecular de VP4: 88 KDa).

Caracterización del papel de proteínas reguladoras de la dinámica del citoesqueleto de actina en la replicación de rotavirus utilizando la interferencia de RNA.

Como un enfoque alternativo para estudiar el papel del citoesqueleto en la replicación de rotavirus, estudiamos el efecto de silenciar la expresión de genes que codifican para proteínas que intervienen en la reorganización del citoesqueleto de actina mediante el uso del sistema de interferencia de RNA (RNAi). Puesto que en nuestro laboratorio se determinó por medio de un tamizaje de varios genes celulares que Diaph, Actn y Rac1 eran posiblemente requeridos en la infección con RRV (Silva-Ayala, datos no publicados), decidimos validar estos resultados y en caso de corroborarlo dilucidar la etapa del ciclo viral en la cual participan. Para ello, células MA104 fueron transfectadas con el RNAi respectivo o un RNAi irrelevante y 72 horas post-transfección las células fueron infectadas con la cepa RRV a una MOI de 3, y a las 12 hpi las células se lisaron y se cuantificó la progenie viral. En estas condiciones observamos un 60% de disminución de la progenie viral total (células más sobrenadante) cuando las células fueron transfectadas con el RNAi de la proteína Rac1 (Figura 26). Esta GTPasa pequeña es una proteína que fomenta la polimerización del filamento de actina, activando a proteínas efectoras como Wave2 y al complejo Arp2/3 (Jaffe y Hall, 2005), lo que sugiere que la polimerización de la actina es requerida para que se sinteticen nuevas partículas virales. En apoyo a lo anterior observamos que al silenciar la

proteína Diaph (proteína efectora que es activada por la GTPasa Rho) la progenie viral disminuye en un 40%. Esta proteína forma parte de la familia de las forminas y promueve la nucleación y elongación del filamento de actina (Goode y Eck, 2007). Por otro lado se observó que la interferencia de Actn disminuyó en un 50% la producción de partículas infecciosas (Figura 26). Actn es una proteína de unión a actina encontrada a lo largo de la F-actina, entrecruzando los filamentos, además de estar presente en las uniones celulares adherentes (Ehrlicher *et al.*, 2015), y los resultados apuntan que su participación en la modulación del polímero de actina es necesaria para que rotavirus lleve a cabo su ciclo infeccioso. La eficiencia de los silenciamientos se evaluó para corroborar que la disminución de la progenie viral se debía a la interferencia de los genes anteriormente mencionados (Figura 27), y a su vez se realizaron ensayos de viabilidad celular por liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (Figura 28), los cuales sugieren que el silenciamiento de estas proteínas no compromete la viabilidad celular.

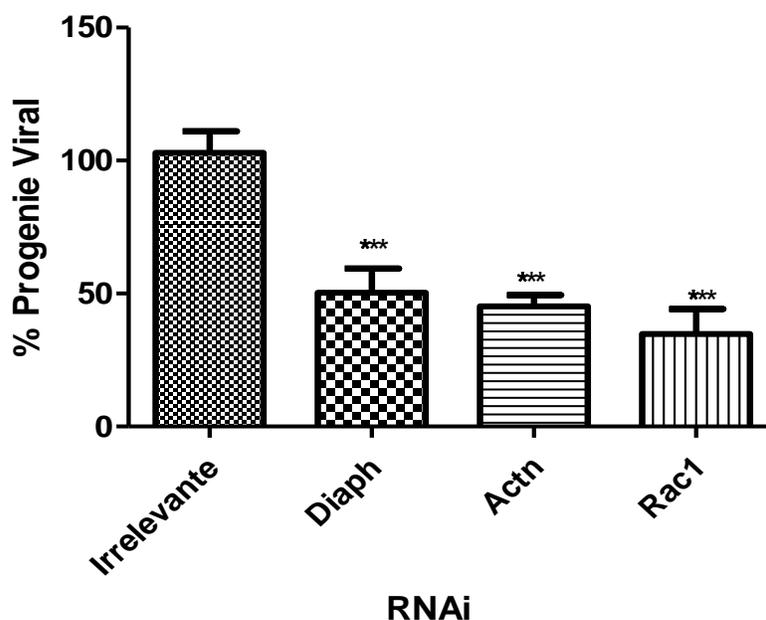


Figura 26. Rotavirus requiere de proteínas que reorganizan el citoesqueleto de actina. Células MA104 fueron transfectadas con los siRNAs indicados y a las 72 horas post-transfección fueron infectadas con RRV (MOI=3). A las 12 hpi las células se lisaron y se determinó la progenie viral infecciosa por medio de un ensayo de inmunoperoxidasa. Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes

(n=3). Los datos son expresados como porcentaje de virus respecto al control (células infectadas transfectadas con un RNAi irrelevante) que fue tomado como el 100% y se analizaron por medio de GraphPad Prism por una prueba de Tukey; *** p<0.001

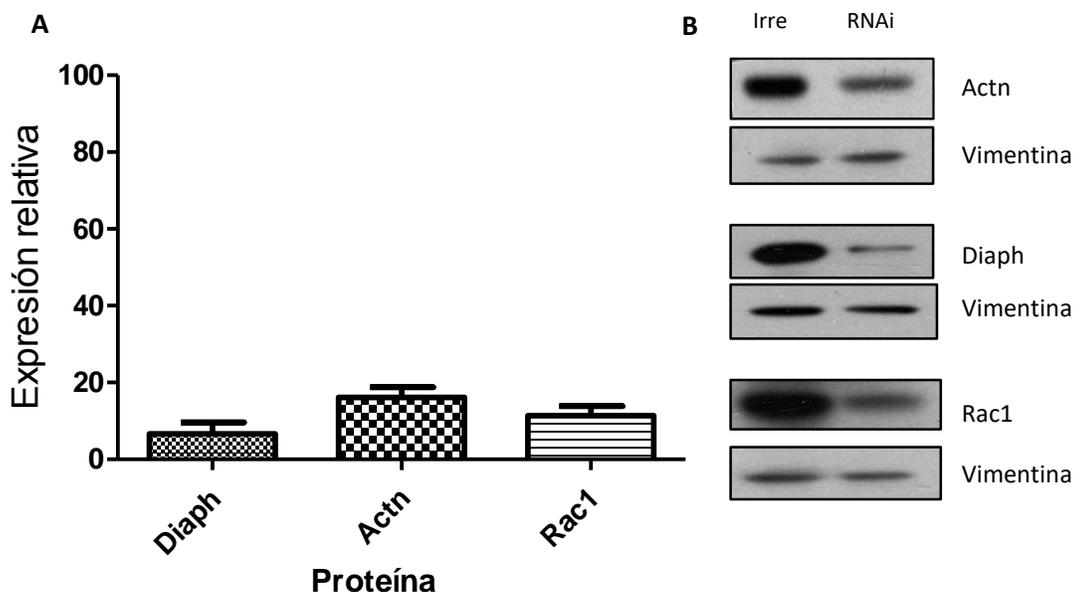


Figura 27. Análisis de la eficiencia de los silenciamientos. Células MA104 fueron transfectadas con el RNAi respectivo o con un RNAi irrelevante (Irre). La eficiencia del silenciamiento se corroboró por Western blot (B) y los datos fueron expresados como unidades de expresión relativa respecto a las células transfectadas con un RNAi irrelevante (A). Como control de carga se utilizó vimentina. Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3).

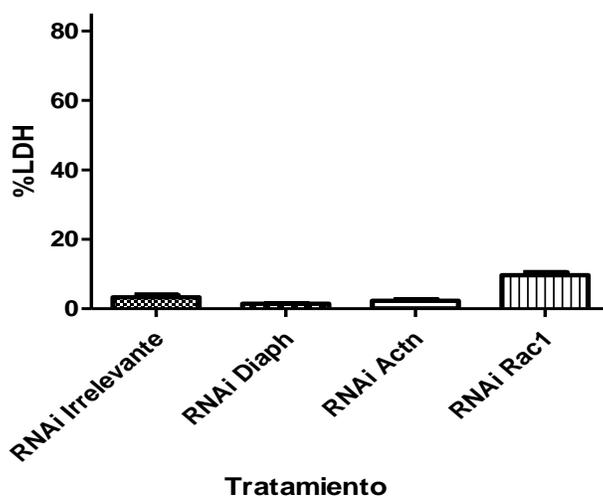


Figura 28. El silenciamiento de Actn, Diaph y Rac1 no afecta la viabilidad celular. Células MA104 se transfectaron con el RNAi respectivo y a las 72 horas post-transfección

se evaluó la liberación de lactato deshidrogenasa como se describe en Materiales y Métodos. Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3)

Los resultados obtenidos sugieren que la adecuada dinámica del citoesqueleto de actina se requiere para la eficiente producción de rotavirus infeccioso. Para corroborar que efectivamente la interferencia de las proteínas Diaph, Actn y Rac1 estaba afectando al citoesqueleto de actina, se analizó su organización por microscopía de inmunofluorescencia utilizando faloidina marcada con fluoresceína, en células transfectadas con los RNAi respectivos, así como también en células infectadas transfectadas o no transfectadas (Figura 29).

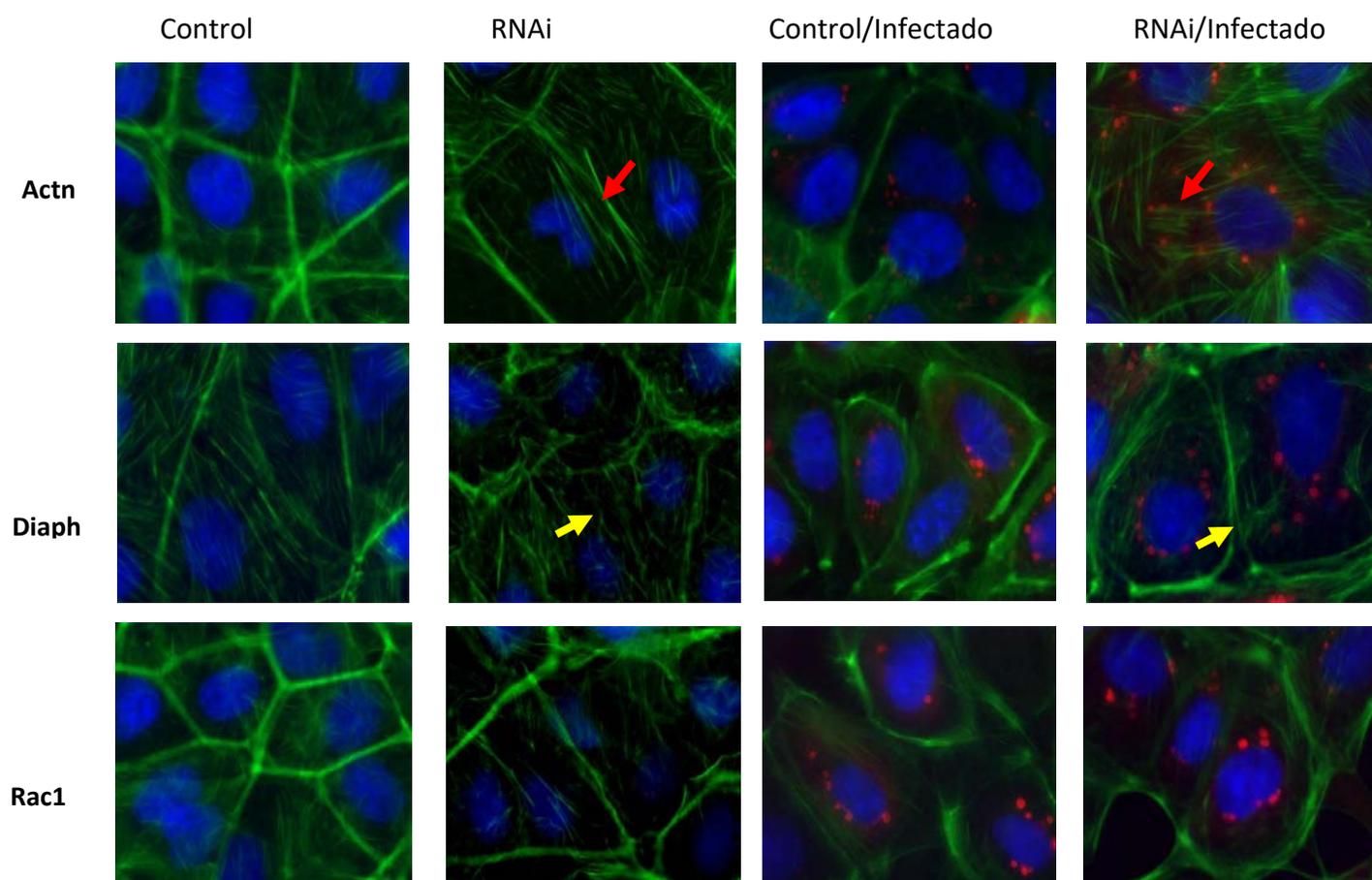


Figura 29. Efecto de los RNAi en la reorganización del citoesqueleto de actina.

Monocapas de células MA104 crecidas en cubreobjetos de vidrio se transfectaron con el RNAi respectivo y 72 h post-transfección se procesaron. El control se transfectó con una RNAi irrelevante. En el caso de las células infectadas, estas se infectaron con la cepa RRV a una MOI de 3 y a las 12 hpi las células fueron fijadas con paraformaldehído y permeabilizadas con Tritón X-100 para su posterior procesamiento por inmunofluorescencia. Como marcador de infección se utilizó un anticuerpo contra NSP2 (rojo), además de DAPI para la tinción de núcleos (azul) y faloidina acoplada a un Alexa flúor 488 para la visualización los filamentos de actina (verde). Flecha roja, fibras de estrés; flecha amarilla, agregados de actina semejantes a centros de nucleación.

El arreglo del citoesqueleto de actina mostró diferencias dependiendo del RNAi utilizado. En el caso de la interferencia de Actn las células mostraron fibras de estrés (Figura 29, flecha roja), las cuales no se formaron en células transfectadas con un RNAi irrelevante, además de mantenerse este fenotipo durante la infección viral. En otras líneas celulares, como HeLa, se ha reportado que la interferencia de Actn no afecta la dinámica del citoesqueleto de actina (Ding *et al.*, 2006), sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales en células MA104, la interferencia de esta proteína siempre reflejó la formación de estos haces paralelos de actina. La interferencia de la proteína Diaph mostró una disrupción de la F-actina y la formación de agregados de actina con haces del filamento aparentemente surgiendo de allí (Figura 29, flecha amarilla), patrón que se repitió en todas las transfecciones con este RNAi y en las células silenciadas e infectadas. En el caso de la GTPasa pequeña Rac1, su silenciamiento generó una pérdida de los haces del filamento de actina, lo cual es consistente con silenciamientos de esta proteína hechos en otras líneas celulares epiteliales, como MDCKII (Noritake *et al.*, 2003). Los tres interferentes mostraron afectar la estructura del citoesqueleto de actina y su silenciamiento redujo la progenie viral, lo que sugiere que rotavirus requiere de esta estructura para generar eficientemente partículas infecciosas, aunque el mecanismo por el cual la actina facilite la producción de viriones maduros aún queda por determinar.

Efecto de los diferentes siRNAs que modifican al citoesqueleto de actina sobre diferentes etapas del ciclo replicativo de rotavirus

Las proteínas Rac1, Diaph y Actn son requeridas en el ciclo replicativo de rotavirus. Para que se efectúe un ciclo infeccioso viral, el virus debe pasar por diferentes etapas (unión y entrada, transcripción y replicación, morfogénesis y liberación), en cada una de las cuales se requieren diversas proteínas celulares. Para conocer el papel de Rac1, Diaph y Actn en la infección viral, evaluamos su papel en distintos pasos del ciclo de infección de rotavirus silenciando la expresión de los genes que las codifican por RNAi.

Debido a los resultados previos obtenidos con jasplakinólido, quisimos investigar en primer lugar si la liberación del virus se veía inhibida en células transfectadas con los diferentes interferentes (siRNAs). Para esto, células transfectadas con los diferentes siRNAs por 72 h, se infectaron con RRV, y a las 12 hpi se tomaron sobrenadantes celulares y se cuantificó la cantidad de virus infeccioso por un ensayo de inmunoperoxidasa. De modo paralelo se cuantificó el virus presente en lisados de células infectadas totales para evaluar si la disminución del virus en sobrenadante se debía a la inhibición de la salida y no a una menor producción de virus infeccioso. Como se aprecia en la Figura 30, observamos una menor cantidad de virus presente en el sobrenadante. Sin embargo, la producción de partículas virales totales (intracelulares+extracelulares) también se abatió, por lo que la relación virus extracelular/virus intracelular para cada siRNA empleado, respecto al control de células transfectadas con un siRNA irrelevante, fue igual en todos los casos, es decir, que se liberaba menos virus como consecuencia de que se producían menos partículas infecciosas (Figura 30). Dado los resultados anteriores los genes trabajados no participan en la salida de rotavirus.

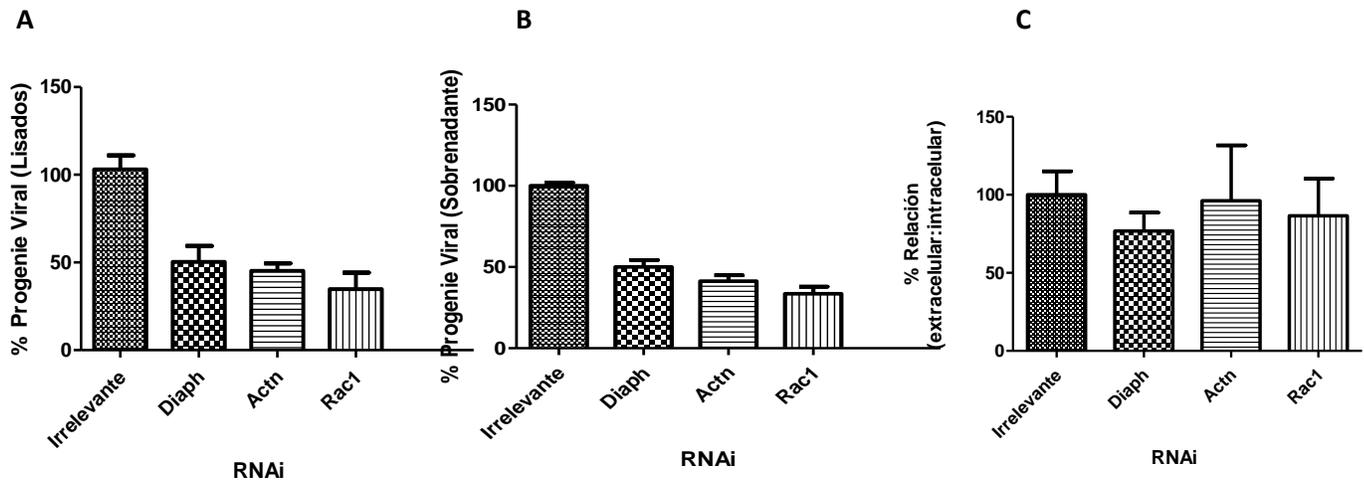


Figura 30. Las proteínas Diaph, Actn y Rac1 no intervienen en la salida de rotavirus de células infectadas. Células MA104 fueron transfectadas con los siRNAs indicados y a las 72 horas post-transfección fueron infectadas con la cepa RRV a una MOI de 3. A las 12 hpi se tomaron sobrenadantes (B) y por otro lado se tomaron lisados de células infectadas (A) y se determinó la progenie viral infecciosa por medio de un ensayo de inmunoperoxidasa. La relación entre virus extracelular e intracelular es mostrada en porcentaje (C). Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3). Los datos son expresados como porcentaje de virus respecto al control (células infectadas transfectadas con un RNAi irrelevante) que fue tomado como el 100%.

Para determinar si las proteínas estudiadas eran requeridas para la entrada del virus o en un paso posterior, DLPs de RRV se transfectaron por lipofección en células silenciadas para cada proteína. De este modo se evita el paso de entrada y las DLPs en el citoplasma celular son capaces de iniciar un ciclo replicativo. Si las proteínas silenciadas están involucradas en el paso de entrada, la infectividad del virus en células transfectadas con DLPs sería muy similar al control, sin embargo, si la proteína silenciada participa en pasos del ciclo viral posteriores a la entrada, la infectividad se vería disminuida. Los resultados obtenidos muestran que la proteína Actn se requiere en el proceso de entrada de RRV, ya que las

células silenciadas con este interferente y transfectadas con las DLPs mostraron una infectividad muy similar al control (Figura 31). Aparentemente la proteína Diaph también participa en el proceso de entrada, ya que al transfectar DLPs a las células silenciadas la infectividad se recupera, aunque no por completo, lo cual sugiere que posiblemente esta proteína intervenga también en otras partes del ciclo viral. En el caso de Rac1 la infectividad disminuyó en la infección con DLPs y TLPs, indicando que esta GTPasa se requiere en un paso del ciclo viral posterior a la entrada. Estos resultados apuntan a que existe una participación de la actina dentro del ciclo viral a diferentes niveles, y que posiblemente pudieran ser modulados por alguna (s) proteína (s) viral (es).

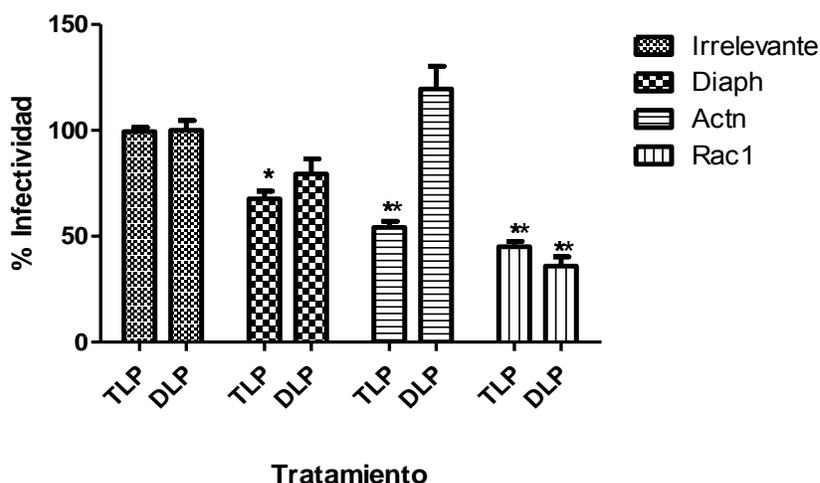
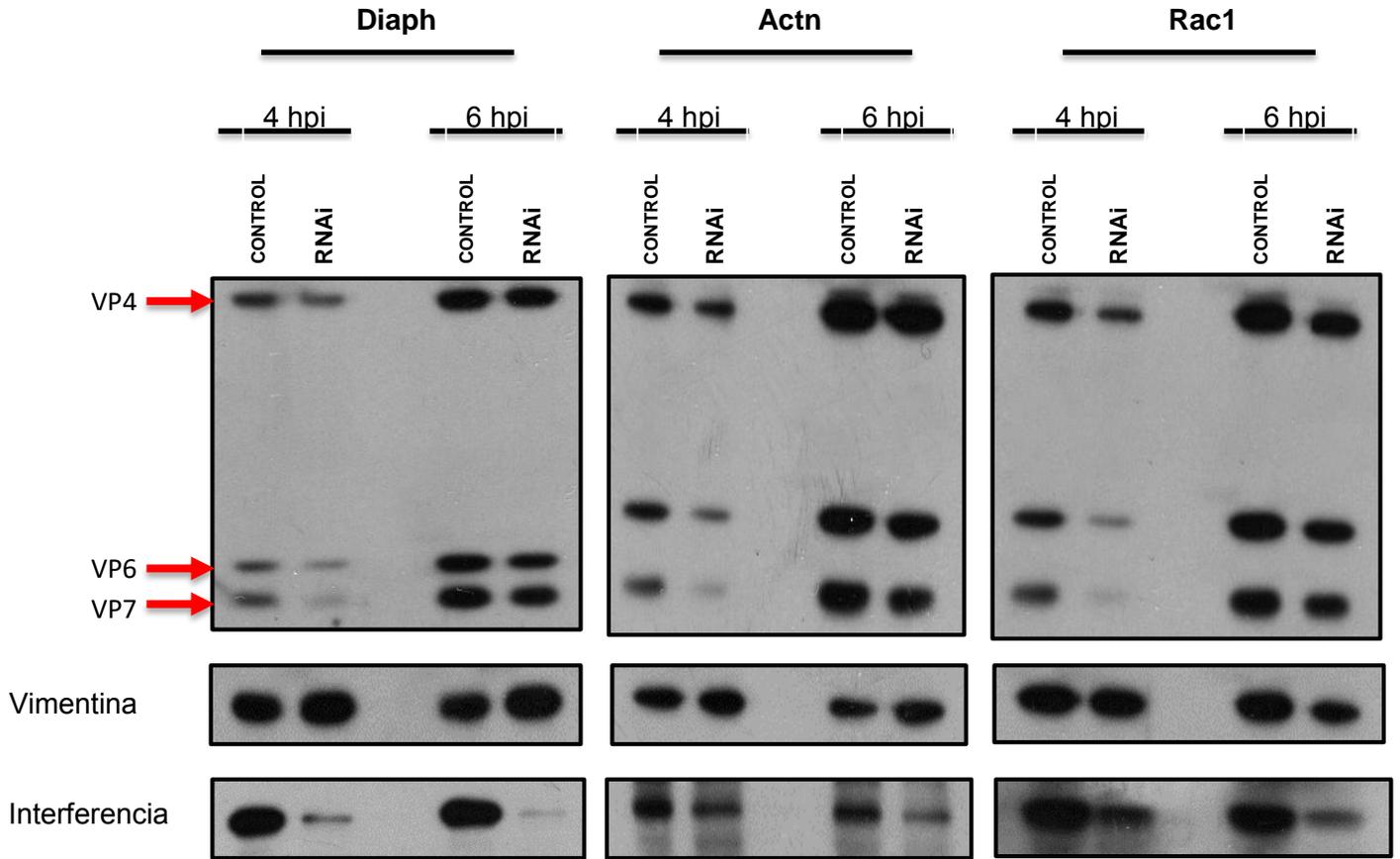


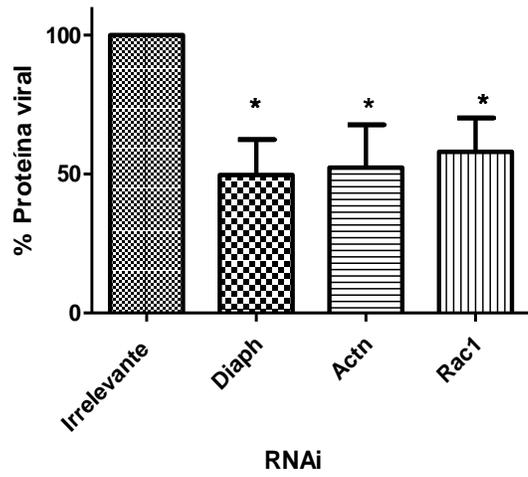
Figura 31. Actn y Diaph son requeridas para la entrada de rotavirus. Células MA104 fueron transfectadas con los RNAi respectivos y a las 72 horas post-transfección fueron infectadas con las cepa RRV (MOI de 0.02) o transfectadas por lipofección con DLPs de RRV. En los dos casos las células fueron incubadas a 37°C hasta 14 hpi y los focos infecciosos se cuantificaron mediante un ensayo de inmunoperoxidasa. Las barras representan el error estándar de la media de tres ensayos independientes (n=3). Los datos son expresados como porcentaje de virus respecto al control (células infectadas transfectadas con un RNAi irrelevante) que fue tomado como el 100%. Los datos se analizaron por medio de GraphPad Prism por una prueba de Tukey; * p<0.01, ** p<0.001.

Rac1 no parece participar en la entrada del virus a las células, por lo que decidimos evaluar si esta GTPasa se necesitaba en la síntesis de proteínas virales. Para ello, células silenciadas para cada interferente respectivo fueron infectadas con la cepa RRV a una MOI de 3 y se incubaron hasta las 4 y 6 hpi; las células fueron posteriormente lisadas y se analizó la síntesis (acumulativa) de proteínas virales por Western blot, utilizando un anticuerpo contra TLPs. Los resultados obtenidos sugieren que el silenciamiento de la expresión de los genes que codifican para las tres proteínas disminuye la cantidad de proteína viral a tiempos tempranos de la infección (Figura 32). Considerando que por el ensayo de transfección de DLPs la proteína Actn mostró participar en la entrada del virus, el hecho de que se observe una menor cantidad de proteína viral se debe probablemente a que el ingreso del virus a la célula fue menor. Diaph aparentemente participa en la entrada del virus, sin embargo, observamos que también disminuyó la síntesis de proteínas, probablemente debido a que participa en el proceso de entrada y en otra etapa posterior del ciclo viral. Por otro lado, Rac1 parece no participar en el proceso de entrada de rotavirus (Fig. 31), sin embargo, los resultados que se muestran en la figura 32 sugieren que esta proteína es importante para la síntesis de proteínas del virus. Cabe mencionar que a tiempos posteriores de la infección (6 hpi) la cantidad de proteína viral acumulada en células silenciadas era muy similar al control, indicándonos que probablemente la síntesis de proteínas virales en las células control alcanzó un umbral máximo detectable por el Western blot y esto permitió que la síntesis de proteínas virales en las células silenciadas alcanzara este rango y por ende no pudiéramos observar diferencias.

A



B



C

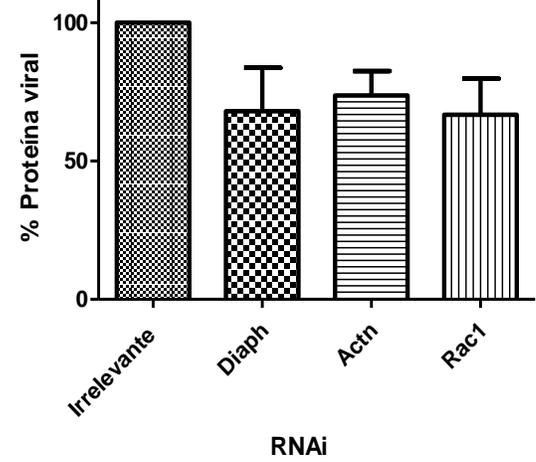


Figura 32. La GTPasa Rac1 se requiere para la síntesis de proteínas de rotavirus. Células MA104 fueron transfectadas con los siRNAs indicados y a las 72 horas post-transfección fueron infectadas con la cepa RRV a una MOI de 3 y se incubaron a 37°C hasta las 4 y 6 hpi. Posteriormente las células fueron lisadas y se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-TLPs para la visualización de las proteínas virales. También se corroboró la eficiencia del silenciamiento para cada interferente (A). Como control de carga se utilizó vimentina. Los datos fueron expresados como % de proteína viral respecto al control (células transfectadas con un RNAi irrelevante) que fue tomado como el 100% a 4 hpi (B) y a 6 hpi (C). Las barras representan el error estándar de la media de cuatro ensayos independientes (n=4). Los datos se analizaron por medio de GraphPad Prism por una prueba de Tukey; * p<0.05.

Considerando que el ensayo de Western blot detecta las proteínas virales acumuladas, decidimos evaluar ahora la síntesis *de novo* de las proteínas virales. Para esto determinamos la incorporación de ³⁵S-Met en las proteínas virales, marcando radiactivamente a las células infectadas por media hora a las 4 y 6 hpi. La incorporación de la marca se evaluó posteriormente por SDS-PAGE y una autorradiografía (Fig. 33). Los resultados indican que no existe diferencia en la síntesis *de novo* de proteínas virales cuando se silencia Rac1, lo cual sugiere que el fenómeno observado con anterioridad en la disminución de síntesis de proteínas virales acumuladas a 4 hpi se debe a una degradación de las mismas o a otro mecanismo inhibitorio en etapas tempranas de la infección. Otro aspecto importante que pudimos notar fue que la síntesis de proteínas celulares se vio disminuida en células no infectadas y silenciadas para Rac1, lo cual nos indica que esta proteína es requerida para la síntesis de proteínas celulares, apuntando a que la disminución de la producción de virus infeccioso pudiera no ser debido a Rac1 directamente, si no a la falta de una proteína (s) celular requerida por el virus y que posiblemente no es sintetizada por la interferencia de Rac1.

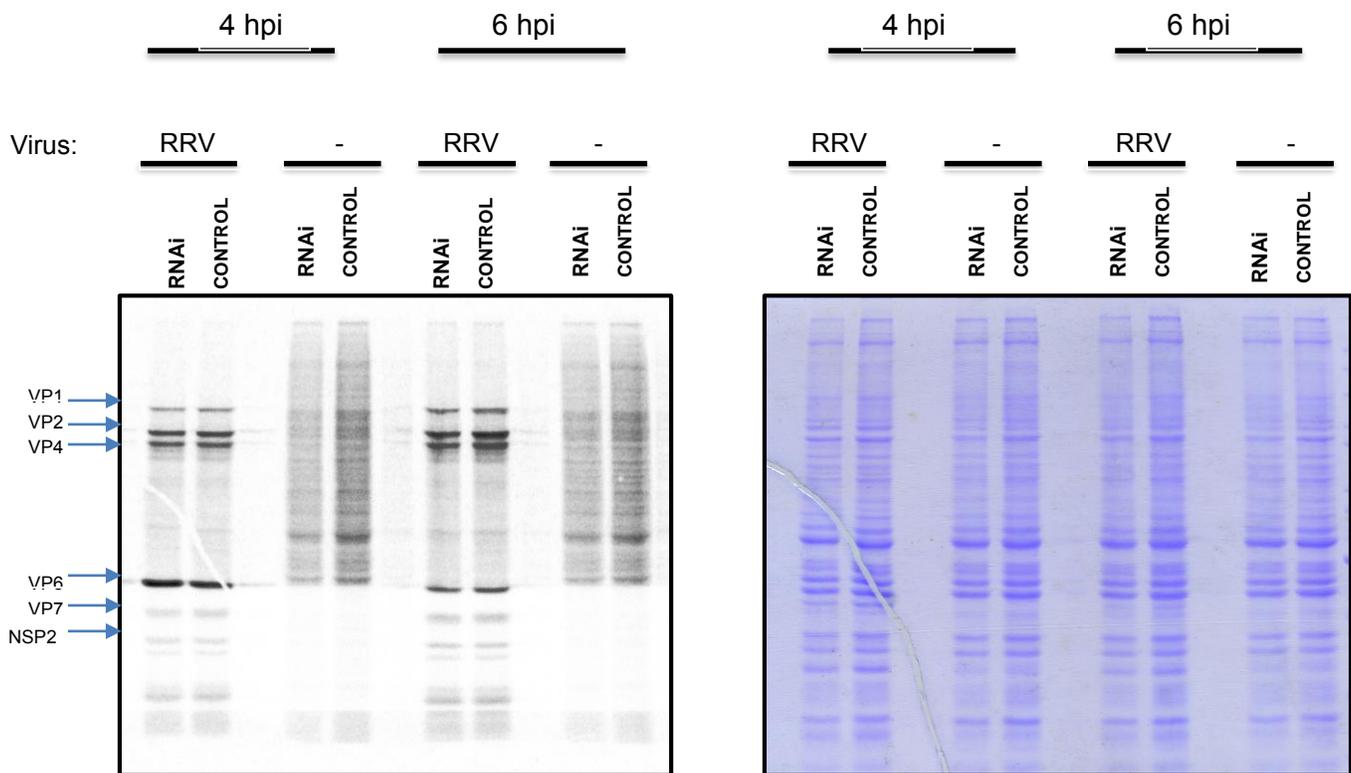


Figura 33. Rac1 afecta la síntesis de proteínas celulares. Células MA104 fueron transfectadas con el RNAi respectivo o un irrelevante y a las 72 horas post-transfección se infectaron con la cepa RRV a una MOI de 3 y se incubaron a 37°C. A 4 y 6 hpi las células fueron incubadas con DMEM sin metionina y con marca radiactiva (S^{35}) por media hora. Tiempo después las células se cosecharon y se analizaron por medio de SDS-PAGE. En la parte izquierda se muestra la autorradiografía del gel y en la parte derecha se muestra el gel teñido con azul de Coomassie como control de carga.

DISCUSIÓN

El citoesqueleto de actina es una estructura altamente dinámica que se encarga de dar forma y movimiento a las células, además de participar en diversos procesos celulares como la fagocitosis, distribución de organelos y la comunicación intercelular (Pollard y Cooper, 2009). Por esta razón muchos virus modulan a esta estructura celular para llevar a cabo su ciclo infeccioso (Taylor *et al.*, 2011). En este proyecto nos concentramos en dilucidar la participación del citoesqueleto de actina en el ciclo de replicación de rotavirus utilizando dos enfoques metodológicos: el uso de fármacos que alteran la dinámica del citoesqueleto y el silenciamiento de proteínas celulares involucradas en la reorganización del mismo.

En el enfoque farmacológico utilizamos tres compuestos que alteran al citoesqueleto de actina (citocalasina D, latrunculina B y jasplakinólido). Ninguno de los tres fármacos estudiados afectó la producción de partículas infecciosas, sin embargo, el jasplakinólido disminuyó la liberación de partículas virales en un 60%. Se ha reportado que este fármaco también afecta la liberación de virus envueltos (con membrana lipídica), como virus sincitial respiratorio (Kallewaard *et al.*, 2005), el virus de sarampión (Dietzel *et al.*, 2013) y el virus dengue (Wang *et al.*, 2010). Históricamente se ha descrito que los virus no envueltos (sin membrana de lípidos), como rotavirus, son liberados de su célula huésped por medio de lisis celular (Tucker y Compans, 1993), sin embargo, estudios realizados en células polarizadas han demostrado que algunos de ellos pueden salir antes de la lisis celular, como poliovirus (Tucker *et al.*, 1993) y SV40 (Clayson *et al.*, 1989). En el caso de rotavirus, Jourdan y colaboradores (1997) demostraron que el virus es capaz de salir de células Caco-2 polarizadas preferentemente por el polo apical, antes de observarse lisis celular. Sin embargo, tradicionalmente se ha descrito que rotavirus sale de células no polarizadas, como MA104, cuando las células se lisan por efecto de la infección. No obstante, en este trabajo observamos que rotavirus comienza a ser liberado de células MA104 a tiempos donde todavía no se detecta lisis celular y que esta liberación es dependiente del citoesqueleto de actina. Es interesante observar que ni citocalasina D ni latrunculina B afectaron la liberación

de rotavirus, en contraste a lo observado con jasplakinólido. Esto pudiera ser explicado por el diferente mecanismo de acción de cada fármaco, puesto que citocalasina D y latrunculina B desestabilizan al filamento de actina: el primero se une directamente al extremo positivo del filamento, provocando su despolimerización, mientras que latrunculina B secuestra a los monómeros de actina, evitando que se incorporen al filamento (Spector *et al.*, 1999). Por su parte, jasplakinólido es un fármaco que induce la polimerización de actina y se une al filamento estabilizándolo (Holzinger, 2009). Esto sugeriría que rotavirus no requiere de la disponibilidad de monómeros de actina para su liberación, aunque pareciera utilizar la dinámica propia del filamento, conocido como *treadmilling* (movimiento de una banda sin fin), para liberarse de las células infectadas. En este proceso la F-actina permanece de tamaño constante mientras existe una constante incorporación de G-actina en el extremo positivo y una disociación en el extremo negativo, lo cual hace que las moléculas unidas al filamento se desplacen a través del citosol. En células polarizadas Caco-2, se ha reportado que la inhibición de este proceso por acción del jasplakinólido disminuye la cantidad de virus liberado (Gardet *et al.*, 2007), lo cual indica que este sistema de liberación viral asociado a actina se encuentra conservado en diferentes sistemas celulares. Por otra parte, cabe resaltar que el fármaco inhibe la salida del virus en las fases iniciales de su liberación (antes de observarse lisis celular), e inclusive en tiempos posteriores (>12 hpi) donde los ensayos de viabilidad muestran ya daño celular, indicando que este mecanismo de liberación dependiente de actina pudiera ser la principal vía de salida y posteriormente se complementaría con el virus liberado de células dañadas como producto de la misma infección.

La visualización a través de microscopía confocal de las células tratadas con jasplakinólido nos permitió apreciar la formación de agregados de F-actina en el citoplasma, dependiente del tiempo de exposición al fármaco, mientras que la actina cortical pareció no modificarse. Esto es consistente con lo reportado en otras líneas celulares epiteliales, donde existe una acumulación de agregados de F-actina al utilizarse este fármaco en tiempos prolongados (Spector *et al.*, 1999).

Estos datos sugieren que los haces de actina citoplasmática son importantes en la liberación del virus y que la actina cortical no participa en dicho proceso.

Dado que se ha reportado que otros virus no envueltos, como poliovirus, hepatitis A y coxsackievirus, pueden ser liberados por medio de estructuras lipídicas como exosomas o microvesículas (Bird *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2013; Robinson *et al.*, 2014), decidimos evaluar la posibilidad de que rotavirus pudiera ser liberado asociado a algún tipo de membranas celulares. El gradiente de flotación de iodixanol mostró que rotavirus se asocia a estructuras lipídicas de baja densidad al salir de las células MA104. A pesar de que se ha descrito que rotavirus sale de las células Caco-2 de manera no lítica, en estas células observamos una cantidad menor de virus extracelular asociado a lípidos, en comparación a las células MA104. Posiblemente esto se deba a que el ciclo infeccioso del virus en Caco-2 es más lento y se requería más tiempo de infección para observar una mayor presencia de virus en el sobrenadante o que en este sistema celular al liberarse el virus se pierde su aparente cubierta lipídica. Lo que resultó similar en ambos casos fue que el jasplakinólido no alteró la interacción virus-membrana y solo disminuyó la cantidad de virus presente en los sobrenadantes. La posible asociación del virus con membranas la investigamos por microscopía electrónica de transmisión del virus extracelular, pero las imágenes adquiridas no nos permitieron observar con claridad al virus vinculado a vesículas; lo que sí pudimos determinar fue que el virus está asociado a ciertas estructuras membranosas. Por otro lado, el análisis por microscopía electrónica de transmisión de cortes de células infectadas en presencia o ausencia del fármaco permitió observar partículas virales dentro de vesículas aparentemente derivadas del retículo endoplásmico. En el proceso de maduración de rotavirus éste gema hacia el lumen del retículo endoplásmico, sin embargo la observación de estos fragmentos de retículo endoplásmico con virus en su interior cerca de membrana plasmática y lejos de los viroplasma podría sugerir que estas membranas funcionan como medio de liberación del virus, sin embargo aún queda mucho por determinar para corroborar esta afirmación.

Los datos anteriores sugieren que rotavirus sale de las células MA104 asociado a membranas, sin embargo el mecanismo por el cual la actina participa en el proceso de liberación del virus no era claro. Para empezar a esclarecer este mecanismo, determinamos la distribución intracelular de las proteínas de superficie del virus. La localización de VP7 no se alteró en presencia del jasplakinólido (datos no mostrados), a diferencia de la localización de VP4, la cual sí se modificó. Reportes previos han mostrado que en células polarizadas Caco-2, VP4 se une a los microfilamentos de actina en la parte apical de las células (*brush border*), provocando la remodelación del filamento, además de que la movilidad intracelular de VP4 es dependiente del *treadmilling* de la F-actina (Gardet *et al.*, 2006, 2007), por lo que nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la distribución intracelular de VP4 depende del citoesqueleto de actina tanto en células polarizadas como en no polarizadas. También observamos que VP4 se encuentra en membrana plasmática en células MA104 desde las 6 hpi, de acuerdo a lo reportado previamente (Nejmeddine *et al.*, 2000), y que el traslado de esta proteína hacia la membrana es sensible al tratamiento con jasplakinólido, apuntando que la F-actina está involucrada en este proceso. Cabe resaltar que Nejmeddine y colaboradores explican el movimiento de VP4 a través de los microtúbulos, ya que observan un arreglo tubular por inmunofluorescencia de la señal de VP4 y posteriormente ven co-localización de VP4 con los microtúbulos. Bajo nuestras condiciones de estudio no pudimos observar este arreglo tubular de VP4 (utilizando los anticuerpos monoclonales HS2 y 2G4), más bien observamos una distribución uniforme de la proteína en el citoplasma. Esto pudiera deberse a que en su trabajo utilizaron otro modelo viral (cepa de rotavirus UK, de origen bovino) y anticuerpos contra la proteína VP4 diferentes a los utilizados por nosotros, además de que no indagaron en el efecto de fármacos que desorganizaban al citoesqueleto de actina, lo cual podría indicar una participación dual del citoesqueleto de actina y microtúbulos en la localización intracelular de VP4.

En virus envueltos como HIV y el virus del sarampión se ha reportado que el traslado de algunas proteínas de la envoltura hacia la membrana plasmática es

dependiente de actina y esto facilita el ensamblaje y la gemación del virus (Ehrnst y Sundquist, 1976; Giuffre *et al.*, 1982), sin embargo en el caso de rotavirus no se conoce con certeza la razón por la cual se requiere que VP4 se traslade a la membrana plasmática. La etapa en la cual se lleva a cabo la incorporación de VP4 en la partícula de triple capa aún es tema de controversia, ya que algunos estudios sugieren que ésta se incorpora en el lumen del retículo endoplásmico (Maass y Atkinson, 1990), mientras que por otro lado se plantea la posibilidad de que las DLPs geman al retículo endoplásmico, adquieren la capa externa compuesta por VP7 y posteriormente interaccionan con las balsas lipídicas, donde VP4 es incorporada al virión (Delmas *et al.*, 2004a). En este trabajo observamos que una parte importante de las partículas de triple capa producidas durante la infección adquieren la VP4 localizada en membrana plasmática, lo cual sugiere que algunos virus llegan a ensamblarse en zonas próximas a la membrana celular o que esta proteína estructural se traslada a la membrana por un mecanismo dependiente de actina y posteriormente es reciclada por el transporte vesicular y llevada posiblemente al ERGIC (compartimiento intermedio entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi), lugar donde se ha propuesto la maduración de VP7 (Mirazimi *et al.*, 1996) y probablemente también la incorporación de VP4.

La asociación rotavirus-balsas lipídicas ha sido vinculada con el proceso de entrada del virus (Isa *et al.*, 2004) y en etapas tardías de la infección, donde se ha observado que VP4 es la proteína responsable de esta interacción (Cuadras *et al.*, 2006). Puesto que jasplakinólido afecta la distribución espacial de VP4 y su traslado a membrana plasmática, evaluamos si también la asociación entre partículas virales y balsas lipídicas dependía del citoesqueleto de actina. Los resultados indican que jasplakinólido decrece la cantidad de virus asociado a *rafts*, lo cual sugiere que la movilidad de VP4 a través del citoesqueleto de actina favorece la interacción entre rotavirus y estos microdominios de membrana. La asociación entre virus y balsas lipídicas se ha reportado en otros virus, como en el caso de influenza y HIV (Scheiffele *et al.*, 1999; Lindwasser y Resh, 2001), donde estos microdominios participan directamente en el ensamblado y liberación del virus. En el caso de rotavirus, Cuadras y Greenberg (2003) describieron que el

virus infeccioso se encuentra asociado a balsas lipídicas *in vitro* e *in vivo*, y que el tratamiento con drogas que interfieren con la integridad de las *rafts* decrece la cantidad de virus asociado a ellas y también disminuye el virus liberado al medio extracelular. Esto concuerda con nuestros resultados, donde observamos que jasplakinólido disminuye la progenie viral liberada y también decrece la asociación entre virus y balsas lipídicas, apoyando la hipótesis de que estos microdominios resistentes a detergentes son requeridos tanto en entrada como en la salida de rotavirus.

El silenciamiento de genes por medio de RNAi ha sido una técnica muy utilizada en nuestro laboratorio, y mediante un tamizaje de 144 genes involucrados en el transporte intracelular de vesículas realizado por Silva-Ayala, utilizando esta metodología, se identificaron varios genes celulares que disminuyeron la infectividad de rotavirus (datos no publicados). Entre estos se encontraron genes que codifican para proteínas involucradas en la reorganización del citoesqueleto de actina: Diaph, Rac1 y Actn. Interesantemente, las tres proteínas participan en diferentes procesos en la dinámica de los microfilamentos de actina. Los datos obtenidos sugieren que estas proteínas son necesarias para el ciclo replicativo de rotavirus. Diaph es una proteína perteneciente a la familia de las forminas que favorece la nucleación y elongación de la F-actina (Goode y Eck, 2007). La función de esta proteína parece ser necesaria en la entrada de rotavirus a la célula. Sin embargo, el mecanismo aún queda por determinar, puesto que estudios previos utilizando citocalasina D sugieren que la cepa RRV no requiere de la polimerización de actina para entrar a células MA104 (Sánchez-San Martín *et al.*, 2004).

Por otro lado, encontramos que la proteína Actn disminuye la infectividad de rotavirus. Esta proteína entrecruza los filamentos de actina y se encuentra en las uniones adherentes celulares, promoviendo la unión de la actina cortical a la membrana plasmática (Ehrlicher *et al.*, 2015), y existen reportes que vinculan a esta proteína como factor de transcripción necesario en la replicación de otros virus, como es el caso de influenza (Sharma *et al.*, 2014). En este trabajo observamos que la inhibición de la síntesis de esta proteína interfiere con la

entrada del virus, indicando que la participación de Actn en la dinámica de la actina cortical es importante para el proceso de entrada. Por otro lado se ha descrito que RRV utiliza integrinas para la adhesión y entrada del virus a la célula (Coulson *et al.*, 1997), y se ha reportado que Actn puede interactuar con diversas integrinas (Otey *et al.*, 1990), lo que sugiere que esta proteína pudiera facilitar la interacción del virus con las integrinas celulares, facilitando su entrada a la célula.

Dentro del sistema de las Rho-GTPasas se encuentran tres GTPasas pequeñas monoméricas que son capaces de modular al citoesqueleto de actina: Rac1, CDC42 y Rho. En trabajos anteriores han observado que dos de ellas se encuentran involucradas en el ciclo replicativo de rotavirus: la activación de Rho es estimulada por la interacción del virus con integrinas, promoviendo la formación de fibras de estrés (Zambrano *et al.*, 2012) y CDC42 es importante en el paso de entrada de la partícula viral (Silva-Ayala *et al.*, 2013). Rac1 es una proteína multifuncional que participa en la reorganización del citoesqueleto de actina, pero que se ha vinculado también con el tráfico intracelular y la endocitosis, con la generación de especies reactivas del oxígeno y en la proliferación celular (Bosco *et al.*, 2008). En nuestro trabajo observamos que la interferencia de Rac1 disminuye la progenie viral de rotavirus. Al indagar en la etapa del ciclo replicativo dónde participaba esta GTPasa observamos que existe una disminución en la síntesis de proteínas virales acumuladas en tiempos tempranos de la infección, detectadas por Western blot. A pesar de que los ensayos de viabilidad no mostraron daño en células transfectadas con este interferente, la caracterización de la síntesis de *nov*o de proteínas celulares y virales, dando un pulso con ³⁵S-Met, reveló que el silenciamiento de Rac1 disminuye la síntesis de proteínas virales, pero también de las celulares, lo que sugiere que el efecto visto en la disminución de la síntesis de progenie viral podría ser un efecto indirecto. Para corroborar esto se podrían usar otras técnicas como fármacos específicos que inhiban a esta proteína o el uso de dominantes negativas para dilucidar si esta pequeña GTPasa es importante para el ciclo infeccioso de rotavirus.

En resumen, los datos generados en este trabajo nos indican que el citoesqueleto de actina participa en los estadios de entrada y salida del ciclo de replicación de rotavirus. Será importante seguir investigando más en detalle el mecanismo a través del cual se libera rotavirus de las células infectadas y qué proteínas celulares se encuentran involucradas en el proceso, además de encontrar el mecanismo por el cual Diaph, Actn y Rac1 afectan la replicación de estos virus.

CONCLUSIONES

- Rotavirus se libera de las células MA104 por un proceso no lítico, al menos en tiempos tempranos de la infección, y este proceso es dependiente del citoesqueleto de actina.
- El virus que se libera de las células infectadas se encuentra asociado a estructuras celulares de baja densidad.
- La proteína VP4 se transporta desde su sitio de síntesis en el citoplasma hasta la membrana plasmática, en la cual queda expuesta en la superficie de la misma, en un proceso dependiente de actina.
- La proteína VP4 en la superficie celular se ensambla en virus infecciosos
- La asociación del virus y de la proteína VP4 a balsas lipídicas es dependiente de actina.
- Las proteínas Actn y Diaph son necesarias para que el virus entre a las células MA104
- Rac1 afecta la progenie viral, posiblemente por un efecto indirecto, al inhibir la síntesis de proteínas celulares.

PERSPECTIVAS

- Investigar el mecanismo por el cual la actina participa en la liberación del virus y determinar si los microtúbulos participan también en este proceso
- Determinar la vía por la cual rotavirus se libera de las células no polarizadas MA104 (vesículas extracelulares, microvesículas, exosomas, etc...)
- Dilucidar el mecanismo por el cual Actn y Diaph participan en la entrada de rotavirus
- Verificar si Rac1 participa directamente en el ciclo infeccioso del virus

REFERENCIAS

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Keith R., Peter W. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed, New York: Garland Science, 965-975.

Altenburg B.C, Graham D.Y, Estes M.K. 1980. Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. *Journal General Virology*, 46:75-85.

Bird S.W., Maynard N.D., Covert M.W., Kirkegaard K. 2014. Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 111:13081-13086.

Boivin D., Beliveau R. 1995. Subcellular distribution and membrane association of Rho-related small GTP-binding proteins in kidney cortex. *The American Journal of physiology*, 269:180-189.

Bosco E.E., Mulloy J.C., Zheng Y. 2008. Rac1 GTPase: A “Rac” of All Trades. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66:370-374.

Brunet J. P., Jourdan N., Cotte-Laffitte J., Linxe C., Geniteau-Legendre M., Servin A.L., Quero A.M. 2000. Rotavirus infection induces cytoskeleton disorganization in human intestinal epithelial cells: implication of an increase in intracellular calcium concentration. *Journal of Virology*, 74:10801–10806.

Bubb M.R., Spector I., Beyer B.B., Fosen K. M. 2000. Effects of Jasplakinolide on the Kinetics of Actin Polymerization. *The Journal of Biological Chemistry* 275:5163-5170.

Burridge K., Wennerberg K. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell*, 116:167-179.

Brown D.A., Rose J.K. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68:533-544.

Clayson E.T., Brando L.V.J., Compans R.W. 1989. Release of simian Virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *Journal of Virology*, 63:2278-2288.

Corbetta, S. 2005. Generation and characterization of Rac3 knockout mice. *Molecular and Cellular Biology*, 25:5763-5776.

Cooper GM. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; *Structure and Organization of Actin Filaments*. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9908/>

Coulson B.S., Londrigan S.L., Lee D.J. 1997. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 94:5389–5394.

Delmas O., Gardet A., Chwetzoff S., Breton M., Cohen J., Colard O., Sapin C., Trugnan G. 2004a. Different ways to reach the top of a cell. Analysis of rotavirus assembly and targeting in human intestinal cells reveals an original raft-dependent, Golgi-independent apical targeting pathway. *Virology*, 327:157-161.

Delmas O., Duran-Schneider A.M., Cohen J., Colard O., Trugnan G. 2004b. Spike protein VP4 assembly with maturing rotavirus requires a postendoplasmic reticulum event in polarized Caco-2 cells. *Journal of Virology*, 78:10987-10994.

Desselberger, U. 2014. Rotaviruses. *Virus Research*, 190:75-96.

Dietrich C., Volovyk Z.N., Levi M., Thompson N.L., Jacobson K. 2001. Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 98:10642-10647.

Dietzel E., Kolesnikova L., Maisner A. 2013. Actin filaments disruption and stabilization affect measles virus maturation by different mechanisms. *Virology Journal*, 10:249.

Dovas A., Couchman J.R. 2005. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochemical Journal*, 390:1-9.

Ehrlicher A.J., Krishnan R., Guo M., Bidan C.M., Weitz D.A., Pollak M.R. 2015. Alpha-actinin binding kinetics modulate cellular dynamics and force generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 112:6619-6624.

Ehrnst, A., and K. G. Sundquist. 1976. Mechanisms of appearance of viral glycoproteins at the cell surface membrane. *Experimental Cell Biology*, 44:198-225.

Estes M.K., Greenberg H. In: Knipe D.M., Howley P.M. 2013. *Fields virology*. 6th ed., Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, 1348-1357.

Eugenin E.A., Gaskill P.J., Berman J.W. 2009. Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Cellular Immunology*, 254:142-148.

Fackler O.T., Kräusslich H.G. 2006. Interactions of human retroviruses with the host cell cytoskeleton. *Current Opinion in Microbiology*, 9:409-415.

Feng Z., Hensley L., McKnight K. L., Hu F., Madden V., Ping L., Jeong S. H., Walker C., Lanford R. E., Lemon S.M. 2013. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature*, 496:367–371.

Fleissner E., Tress E. 1973. Chromatographic and electrophoretic analysis of viral proteins from hamster and chicken cells transformed by Rous sarcoma virus. *Journal of Virology*, 11:250-262.

Fontana J., López N., Elliot R., Fernández J. J., Risco C. 2008. The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cellular Microbiology*, 10:2012-2028.

Gardet A., Breton M., Fontanges P., Trugnan G., Chwetzoff S. 2006. Rotavirus spike protein VP4 binds to and remodels actin bundles of the epithelial brush border into actin bodies. *Journal of Virology*, 80:3947-3956.

Gardet A., Breton M., Trugnan G., Chwetzoff S. 2007. Role for actin in the polarized release of rotavirus. *Journal of Virology*, 81:4892-4894.

Giuffre R., Tovell D., Kay C., Tyrrell D. 1982. Evidence for an Interaction between the Membrane Protein of a Paramyxovirus and Actin. *Journal of Virology*, 42:963-968.

Goldman R.D., Chang C., Williams J.F. 1975. Properties and behavior of hamster embryo cells transformed by human adenovirus type 5. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 39:601-614.

Goldschmidt P.J., Furman M.I., Wachsstock D., Safer D., Nachmias V.T., Pollard T.D. 1992. The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Molecular Biology of the Cell*, 3:1015-24.

Goode B.L., Eck M.J. 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annual Review of Biochemistry*, 76:593-627.

González R.A., Espinosa R., Romero P., Lopez S., Arias C.F. 2000. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Archives of Virology*, 145:1963-1973.

Gratia M., Sarot E., Vende P., Charpilienne A., Baron C.H., Duarte M., Pyronnet S., Poncet D. 2015. Rotavirus NSP3 is a translational surrogate of the poly(A) binding protein-poly(A) complex. *Journal of Virology*, 89:8773–8782.

Greene W., Gao S.J. 2009. Actin dynamics regulate multiple endosomal steps during Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus entry and trafficking in endothelial cells. *PLoS Pathogens*, 5:e1000512.

Guerrero C.A., Bouyssounade D., Zárate S., Isa P., López T., Espinosa R., Romero P., Méndez E., López S., Arias C.F. 2002. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *Journal of Virology*, 76:4096–4102.

Gupton S.L., Gertler F.B. 2007. Filopodia: the fingers that do the walking. *Science STKE*, 400:re5

Gutiérrez M. 2011. Caracterización de la vía de entrada de los rotavirus. Tesis de Doctorado, UNAM.

Gutiérrez M., Isa P., Sánchez C., Pérez J., Espinosa R., Arias C.F., López S. 2010. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology*, 84:9161–9169.

Hall A. 1990. The cellular function of small GTP-binding proteins. *Science*, 249:635-640.

Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279:509-514.

Hall A. 2012. Rho family GTPases. *Biochemical Society Transactions*, 40:1378-1382.

Hall A., Nobes C.D. 2000. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 355:965-970.

Harpen M., Barik T., Musiyenko A., Barik S. 2009. Mutational analysis reveals a non-contractile but interactive role of actin and profilin in viral RNA-dependent RNA synthesis. *Journal of Virology*, 83:10869-10876.

Hawkins M., Pope B., Maciver S.K., Weeds A.G. 1993. Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments. *Biochemistry* 32:9985-9993.

Heasman S.J., Ridley A.J. 2008. Mammalian Rho GTPases: a new insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9:690-701.

Holzinger A. 2009. Jasplakinolide: an actin-specific reagent that promotes actin polymerization. *Methods Molecular Biology*, 586:71-87.

Isa P., Realpe M., Romero P., López S., Arias C.F. 2004. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology*, 322:158.

Jaffe A.B., Hall A. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual Review of Cell and Developmental and Biology*, 21:247-269.

Jayaram H., Estes M.K., Prasad B.V. 2004. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus research*, 101:67-81.

Jiménez-Baranda S., Gómez-Moutón C., Rojas A., Martínez-Prats L., Mira E., Lacalle R., Valencia A., Dimitrov D.S., Viola A., Delgado R., Martínez A.C., Mañes S. 2007. Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors. *Nature Cell Biology*, 9:838-846.

Jourdan N., Maurice M., Delautier D., Quero A.M., Servin A.L., Trugnan G. 1997. Rotavirus Is Released from the Apical Surface of Cultured Human Intestinal Cells through Nonconventional Vesicular Transport That Bypasses the Golgi apparatus. *Journal of Virology*, 71:8268-8278.

Jourdan N., Brunet J. P., Sapin C., Blais A., Cotte-Laffitte J., Forestier F., Quero A.M., Trugnan G., Servin A.L. 1998. Rotavirus infection reduces sucrase-isomaltase expression

in human intestinal epithelial cells by perturbing protein targeting and organization of microvillar cytoskeleton. *Journal of Virology*, 72:7228–7236.

Kallewaard N. L., Boxena A. L., Crowe J. E. 2005. Cooperativity of actin and microtubule elements during replication of respiratory syncytial virus. *Virology*, 331:73-81.

Lehmann M.J., Sherer N.M., Marks C.B., Pypaert M., Mothes W. 2005. Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *The Journal of Cell Biology*, 170:317-325.

López T., Camacho M., Zayas M., Najera R., Sánchez R., Arias C.F., López S. 2005. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *Journal of Virology*, 79:184-192.

Lassing I., Lindberg U. 1985. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature*, 314:472-474.

Lindwasser O.W., Resh M.D. 2001. Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *Journal of Virology*, 75:7913-7924.

Maass D.R, Atkinson P.H. 1990. Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. *Journal of Virology*, 64:2632-2641.

Martínez J.L. 2015. Análisis de la función del complejo proteico COPI en el ciclo de replicación de rotavirus. Tesis de Maestría, UNAM.

Mason B., Graham D., Estes M. 1980. In Vitro Transcription and Translation of Simian Rotavirus SA11 Gene Products. *Journal of Virology*, 33:1111-1121.

McNulty M.S., Curran W.L., McFerran J.B. 1976. The morphogenesis of a cytopathic bovine rotavirus in Madin Darby bovine kidney cells. *Journal of General Virology*, 33:503-508.

Mercer J., Helenius A. 2008. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science*, 320:531-535.

Mercer J., Schelhaas M., Helenius A. 2010. Virus entry by endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 79:803-833.

Mirazimi A., Von Bonsdorff C.H., Svensson L. 1996. Effect of brefeldin A on rotavirus assembly and oligosaccharide processing. *Virology*, 217:554-563.

Nejmeddine M., Trugnan G., Sapin C., Kohli E., Svensson L., López S., Cohen J. 2000. Rotavirus spike protein VP4 is present at the plasma membrane and is associated with microtubules in infected cells. *Journal of Virology*, 74:3313-3320.

Nobes C.D., Hall A. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81:53-62.

Noritake J., Fukata M., Sato K., Nakagawa M., Watanabe T., Izumi N., Wang S., Fukata Y., Kaibuchi K. 2003. Positive role of IQGAP1, an effector of Rac1, in actin-meshwork formation at sites of cell-cell contact. *Molecular Biology of the Cell*, 15:1065-1076.

Organization, World Health. 2016. Rotavirus infections [En línea]. Consultado en: http://www.who.int/topics/rotavirus_infections/en/.

Organization, World Health. 2016. Immunization, vaccines and biological [En línea]. Consultado en: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/rotavirus/en/.

Otey C.A., Pavalko F.M., Burridge K. 1990. An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *The Journal of Cell Biology*, 111:721-729.

Patton J.T. 1990. Evidence for equimolar synthesis of double-strand RNA and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *Virus Research*, 17:199-208.

Patton J.T., Silvestri L. S., Tortorici M. A., Vasquez R., Taraporewala Z. F. 2006. Rotavirus genome replication and morphogenesis: role of the viroplasma. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 309:169-187.

Parashar U.D., Gibson C.J., Bresse J.S., Glass R.I. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*, 12:304–306.

Pollard T.D., Cooper J.A. 2009. Actin a central player in cell shape and movement. *Science*, 326:1208-1212.

Poncet D., Laurent S., Cohen J. 1994. Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO Journal*, 13:4165–4173.

Ridley A.J., Hall A. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70:389-399.

Ridley A.J., Paterson H.F., Jhonston C.L., Diekmann D., Hall A. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70:401-410.

Ridley A.J. 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology*, 16:522-529.

Robinson S.M., Tsueng G., Sin J., Mangale V., Rahawi S., McIntyre L.L., Williams W., Kha N., Cruz C., Hancock B.M. 2014. Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. *PLoS Pathogens*, 10:e1004045.

Rossman K.L., Der C.J., Sondek, J. 2005. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6:167-180.

Sapin C., Colard O., Delmas O., Tessier C., Breton M., Enouf V., Chwetzoff S., Ouanich J., Cohen J., Wolf C., Trugnan G. 2002. Rafts promote assembly and atypical targeting of a nonenveloped virus, rotavirus, in Caco-2 cells. *Journal of Virology*, 76:4591-4602.

Sánchez-San Martín C., López T., Arias C.F., López S. 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *Journal of Virology*, 78:2310-2318.

Sharma S., Mayank A.K., Nailwal H., Tripathi S., Patel J.R., Bowzard J.B., Gaur P., Donis R., Katz J., Cox N., Lal R., Farooqi H., Sambhara S., Lal S.K. 2014. Influenza A viral nucleoprotein interacts with cytoskeleton scaffolding protein α -actinin-4 for viral replication. *The FEBS Journal*, 281: 2899-2914.

Scheiffele P., Rietveld A., Wilk T., Simons K. 1999. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 274:2038-2044.

Schliwa M. 1982. Action of Cytochalasin D on Cytoskeletal Networks. *The Journal of Cell Biology*, 192:79-91.

Shirsat N.V., Pignolo R.J., Kreider B.L., Rovera G.A. 1990. Member of the ras gene superfamily is expressed specifically in T, B and myeloid hemopoietic cells. *Oncogene*, 5:769-772.

Shurety W., Stewart N. L., Stow J. L. 1998. Fluid-phase markers in the basolateral endocytic pathway accumulate in response to the actin assembly-promoting drug Jasplakinolide. *Molecular Biology of the Cell*, 9, 957–975

Silva-Ayala D., López T., Gutiérrez M., Perrimon N., López S., Arias C.F. 2013. Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 110:10270–10275.

Spector I., Braet F., Shochet N.R., Bubb M.R. 1999. New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microscopy Research Technique*, 47:18-37.

Stallcup K.C., Raine C.S., Fields B.N. 1983. Cytochalasin B inhibits the maturation of measles virus. *Virology*, 124:59-74.

Taylor J.A., O'Brien J.A., Yeager M. 1996. The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *EMBO Journal*, 15:4469-4476.

Taylor M. P., Koyuncu O. O., Enquist L. W. 2011. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nature Reviews Microbiology*, 9:427–439.

Tcherkezian J., Lamarche-Vane N. 2007. Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biology of the Cell*, 99:67-86.

Trask S.D., Kim I.S., Harrison S.C., Dormitzer P.R. 2010. A rotavirus spike protein conformational intermediate binds lipid bilayers. *Journal of Virology*, 84:1764–1770.

Tucker S.P., Compans R.W. 1993. Virus infection of polarized epithelial cells. *Advances in Virus Research*, 42:187-247.

Tucker S.P., Thornton C.L., Wimmer E., Compans R.W. 1993. Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *Journal of Virology*, 67:4274-4282.

Wakatsuki T., Schwab B., Thompson N.C., Elson E.L. 2001. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *Journal of Cell Science*, 114:1025-1036.

Wang J., Zhang J., Chen W., Xu X., Gao N., Fan D., An J. 2010. Roles of Small GTPase Rac1 in the Regulation of Actin Cytoskeleton during Dengue Virus Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4:e809

Wang W., Eddy R., Condeelis J. 2007. The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 7:429-440.

Wegner A., Isenberg G. 1983. 12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 80:4922-4925.

Xia W., Zhang J., Ostaszewski B. L., Kimberly W. T., Seubert P., Koo E. H., Shen J., Selkoe D. J. 1998. Presenilin 1 regulates the processing of beta-amyloid precursor protein C-terminal fragments and the generation of amyloid beta-protein in endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochemistry*, 37:16465–16471.

Zambrano J. L., Díaz Y., Peña F., Vizzi E., Ruiz M. C., Michelangeli F., Liprandi F., Ludert J. E. 2008. Silencing of rotavirus NSP4 or VP7 expression reduces alterations in Ca²⁺ homeostasis induced by infection of cultured cells. *Journal of Virology*, 82:5815–5824.

Zambrano J. L., Sorondo O., Alcalá A., Vizzi E., Díaz Y., Ruiz M. C., Michelangeli F., Liprandi F., Ludert J. E. 2012. Rotavirus infection of cells in culture induces activation of RhoA and changes in the actin and tubulin cytoskeleton. *Public Library of Science One*, 7: e47612.

Zárate S., Cuadras M., Espinosa R., Romero P., Juárez K., Camacho-Nuez M., Arias C.F., López S. 2003. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *Journal of Virology*, 13:7254-7260.