

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DEL PAPEL DEL COMPLEJO MOTOR DE DINEÍNA EN LA MIGRACIÓN INTRACELULAR DE LOS VIROPLASMAS DE ROTAVIRUS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: Maestro en Ciencias

PRESENTA: BIÓL. MAXIMINO SANTIAGO MÉNDEZ

> TUTOR PRINCIPAL DR. LUIS PADILLA NORIEGA Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR DRA. HERMINIA DE JESÚS LOZA TAVERA Facultad de Química, UNAM DR. JUAN MIRANDA RÍOS Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad de México, Junio, 2023



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Financiamiento.

La realización de este proyecto fue financiada parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), CB2011/168046. Otro apoyo fue brindado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), IN201212. También se recibió apoyo del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Agradecimientos.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me otorgó con registro 254026 y CVU 390748 durante el periodo 2011-2012.

Agradezco al Consejo Mexiquense de Ciencia de Tecnología por el Programa de Promoción de Tesis de Maestría con registro 14BTM0389 durante el periodo 2014.

Agradezco al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, y en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, donde se realizó este trabajo bajo la dirección del Dr. Luis Padilla Noriega.

Agradezco al Dr. Luis Padilla Noriega por su tutoría, apoyo, paciencia y tiempo para la culminación de este proyecto.

Agradezco al Dr. Renato León Rodríguez por asistencia técnica y teórica durante la realización de este proyecto y a mis compañeros de laboratorio Dr. Hugo Israel Contreras Treviño y Dr. Edgar Reyna Rosas

Agradezco a los integrantes de mi comité tutorial: la Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera y el Dr. Juan Miranda Ríos por sus valiosos comentarios durante la realización de esta tesis.

Agradezco a los integrantes del Jurado de Examen para la obtención del grado de Maestría: Dra. Blanca Hayde Ruiz Ordaz, Dra. Ana María Cevallos Gaos, Dra. Rosa Estela Navarro González, Dr. Ramón Antonio González García-Conde, Dr. Javier Ambrosio Hernández (finado), Dr. Ramón Antonio González García-Conde y Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva por sus valiosos comentarios.

Agradezco a la Dra. Tzipe Govezensky por el apoyo y asesoría brindada para realizar el análisis estadístico, así como sus valiosos comentarios durante la realización de esta tesis.

Agradezco a la Dra. Ana María Fernández por el apoyo y espacio brindado en su laboratorio para la realización de esta tesis.

A mis padres Hortencia y Maximino por toda su confianza y apoyo para continuar con mis estudios.

A mis hermanos Nancy y Omar por esta su comentarios durante todo este tiempo.

A mi esposa Erika por su valiosa compañía, comentarios y motivación para culminar este proyecto.

Índice.

Resumen	3
Abreviaturas	1
Introducción	5
Clasificación	ò
Estructura del virión	7
Genoma y proteínas	3
Ciclo Replicativo 11	I
Dinámica de formación de los viroplasmas16	5
Microtúbulos)
Complejo motor de dineína24	4
Cadena Pesada de Dineína 25	5
Cadenas intermedias de dineína 26	3
Cadenas intermedias ligeras de dineína27	7
Cadenas ligeras de dineína27	7
TCTEX	3
LC8	3
ROBL	3
Complejo de Dinactina)
Movimiento intracelular viral asociada al CMD 32	2
Antecedentes: Asociación de viroplasmas de RVA con la red de MTs 39)
Hipótesis42	2
Objetivo general	3
Objetivos particulares 43	3
Materiales y métodos 44	4
Resultados51	1
Cinética de distancia al núcleo, número y tamaño de viroplasmas de RVA SA11 a 6, 10, 14 y 18 hpi51	1

Efecto de la sobre-expresión de p50 en el número, tamaño y distribución de los viroplasmas hacia el núcleo de células infectadas con RVA SA11 a 10 y 18 hpi57
Cuantificación de la distancia de los viroplasmas hacia la región perinuclear a 10 y 18 hpi en células BSC1 infectadas con RVA SA11 y transfectadas con pEGFP-p50 ó pEGFP60
Cuantificación de área y número de viroplasmas a 10 y 18 hpi en células BSC1 infectadas con RVA SA11 y transfectadas con pEGFP-p50 ó pEGFP. 62
Efecto de la inhibición de CMD en la formación de viroplasmas en células BSC1 áinfectadas con RVA SA11 a 10 y 18 hpi
Cuantificación de la distancia de los viroplasmas hacia la región perinuclear a 10 y 18 hpi en células BSC1 infectadas con RVA SA11 y tratadas con Ciliobrevina D69
Cuantificación de área y número de viroplasmas a las 10 y 18 hpi en células BSC1 infectadas con SA11 y tratadas con Ciliobrevina D
Discusión76
Conclusiones
Perspectivas
Referencias

Resumen.

Los Rotavirus del grupo A (RVA), de la familia Reoviridae, son el principal agente de gastroenteritis en niños menores de 5 años, tienen un genoma de 11 segmentos de RNA de cadena doble que codifican por 6 proteínas estructurales (VPs) y 6 no estructurales (NSPs). La replicación de los RVA ocurre en el citoplasma, en cuerpos de inclusión denominadas viroplasmas, en donde también se lleva a cabo el ensamble de los viriones. Los viroplasmas contienen a los RNA virales y las proteínas NSP2, NSP5, VP1, VP2, VP3 y VP6. En células infectadas con RVA el número de viroplasmas decrece con el tiempo, mientras que su área se incrementa y se van movilizando a la región perinuclear. Se sabe que NSP2 interacciona con los microtúbulos (MTs) y que esta red es necesaria para el crecimiento y desplazamiento de los viroplasmas hacia la región perinuclear. En este estudio determinamos el efecto en la movilidad y crecimiento de los viroplasmas al afectar el funcionamiento del complejo motor de dineína (CMD), que utiliza a los MTs para el movimiento de diversas cargas celulares. Para inhibir la función del CMD, se sobreexpresó p50, un subcomponente de este complejo que si se encuentra en exceso, inhibe la función de CDM o se trató con la droga Ciliobrevina D, que es un inhibidor de la ATPasa del CMD. Encontramos mediante ensayos de inmunofluorescencia de células BSC1 infectadas con el RVA SA11 que el mayor desplazamiento de viroplasmas hacia la región perinuclear ocurre entre las 10 y 18 horas post-infección, desplazándose en promedio de 5.5 a 6 µm en este lapso de tiempo. En contraste, al sobreexpresar p50 fusionada a la proteína verde fluorescente la migración se redujo a 1 µm y al tratar con Ciliobrevina D se redujo a solamente 0.8 µm. También observamos que con ambos tratamientos se afectó el aumento en tamaño y disminución en número de los viroplasmas. Estos hallazgos sugieren que el CMD participa en el movimiento y crecimiento de los viroplasmas de RVA.

Abreviaturas.

AAA	ATPasa Asociada a varias Activades celulares			
ASFV	Virus de la fiebre porcina africana			
BicD1	Bicaudal 1			
CaCo-2	Células de carcinoma de colón			
CD	Complejo de dinactina			
CMD	Complejo motor de dineína			
DHC	Cadena pesada de dineína			
DIC	Cadena intermedia de dineína			
DLC	Cadena ligera de dineína			
DLIC	Cadena intermedia ligera de dineína			
DLPs	Partículas de doble capa			
Extremo (-)	Extremo menos			
Extremo (+)	Extremo más			
Eg5	Quinesina 5			
GFP	Proteína verde fluorescente			
EGFP	Proteína verde fluorescente realzada			
EGFP-p50	Proteína verde fluorescente realzada fusionada con p50			
hpi	Horas post-infección			
hr, hrs	Hora, horas			
MEM	Medio mínimo esencial			
MEM-ss	Medio mínimo esencial sin suero			
min	Minuto o minutos			
MOI	Multiplicidad de infección			
MT	Microtúbulo			
MTOC	Centro organizador de microtúbulos			
MTs	Microtúbulos			
RE	Retículo endoplásmico			
RNA-	RNA de sentido negativo			
RNA+	RNA de sentido positivo			
RNAcs	RNA de cadena sencilla			
RNAdc	RNA de doble cadena			
RNAm	RNA mensajero			
RVA	Rotavirus de la especie/grupo A			
SLPs	Partículas de una capa			
TLPs	Partículas de triple capas			
VLS	Estructuras similares a los viroplasmas			

Introducción.

La gastroenteritis aguda es reconocida alrededor del mundo como la principal causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años. Entre los agentes etiológicos que causan este padecimiento se encuentran: toxinas, bacterias, parásitos y virus. Los rotavirus de la especie/grupo A (RVA) son el principal agente etiológico de gastroenteritis aguda infantil, estos fueron identificados en 1973 por primera vez en biopsias del intestino delgado de niños que presentaban diarrea de origen no bacteriano. El nombre de los RVA proviene del latín *rota* que significa rueda (Fig. 1) (Estes y Kapikian, 2007; Carter y Saunders, 2007).



Figura 1. Microscopía electrónica de partículas de RVA. Barra= 100 nm (Tomado de Kapikian et al., 1974).

Se estima que los RVA son responsables de 611,000 muertes al año a nivel mundial (Parashar *et al.*, 2006) y también son causantes de diarrea en muchas especies de mamíferos y de aves (Parashar *et al.*, 2006; Estes y Kapikian, 2007). La principal ruta de transmisión de RVA es fecal-oral, aunque se ha propuesto que el contacto persona a persona con secreciones respiratorias y/o superficies contaminadas pudieran ser fuentes de transmisión (Cook *et al.*, 2004).

Clasificación.

La familia *Reoviridae* incluye a dos subfamilias (*Sedoreovirinae y Spinareovirinae*) y 15 géneros. El género *Rotavirus* se encuentra clasificado en el taxón *Sedoreovirinae* (Attoui y Mertens, 2008). La familia comparte una serie de características morfológicas y moleculares: el virión tiene un genoma de RNA de doble cadena (RNAdc) segmentado, presenta una geometría icosahédrica, sin envoltura lipídica y contienen las enzimas necesarias para la producción de sus RNA mensajeros (RNAm), los cuales presentan una caperuza (CAP) en el extremo 5' pero carecen de una cola de poli-A en el extremo 3' y la replicación viral ocurre en el citoplasma (Parashar *et al.*, 1998; Pesavento *et al.*, 2006; Patton *et al.*, 2006; Shaw y Greenberg, 1999).

El género *Rotavirus* se divide en especies (antes denominadas grupos) y serotipos. La clasificación de especies ha sido definida en base a la antigenicidad y la identidad de la secuencia de nucleótidos de la proteína VP6 (Matthijnssens *et al.*, 2012), y se reconocen 10 especies (A-J) (Crawford, *et al.*, 2017). Los rotavirus de la especie A son los principales causantes de la diarrea infantil en humanos, la especie B se ha asociado con brotes epidémicos de diarrea en adultos de China y la India, y la especie C se presenta en casos esporádicos de infecciones proteína. Así mismo, VP6 determina no solo la especificidad de especie sino también los subgrupos l y ll que se distinguen en base a la reactividad de anticuerpos monoclonales contra esta proteína viral (Kapikian *et al.*, 1981; Greenberg *et al.*, 1983). Los RVA también se han clasificado en serotipos en base a ensayos de neutralización cruzada con sueros hiperinmunes producidos con virus purificados (Wyatt *et al.*, 1982; Sato *et*

al, 1982). Los determinantes de serotipo dependen de los polimorfismos presentes en las proteínas de superficie VP4 y VP7, ya que ambas proteínas son capaces de inducir anticuerpos neutralizantes. Los serotipos derivados de VP7 se denominan G (VP7 es una glicoproteína), mientras que los derivados de VP4 se denominan P (VP4 es sensible a proteasas). Hasta ahora se han identificado 14 serotipos G y 11 serotipos P. Para la realización del presente trabajo se utilizó la cepa de RVA SA11 (simian antigen 11), del serotipo P5B y G3, aislado originalmente de mono vervet (*Chlorocebas pygerythrus*) (Hoshino y Kapikian, 2000; Jayaram *et al.*, 2004; Mathieu *et al.*, 2001; Parashar *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 2008; Estes y Kapikian, 2007; Kirkwood, 2010; Matthijnssens *et al.*, 2012).

Estructura del virión.

Las partículas de RVA o viriones son icosahédricas, presentan un diámetro de aproximadamente 100 nm (76.5 excluyendo las espículas superficiales) y están organizados por tres capas concéntricas formadas por seis proteínas estructurales. Las partículas de triple capa (TLPs) son la forma infectiva, están formadas en su capa más externa por 780 moléculas de la glicoproteína VP7 en un arreglo de 260 trímeros y de 60 espículas que están formadas posiblemente por trímeros de VP4 (Li *et al.*, 2009).

Las partículas de doble capa (DLPs) tienen un diámetro de aproximadamente 70.5 nm, la capa intermedia está formada por 780 moléculas de la proteína VP6 en un arreglo de trímeros, siendo el principal antígeno viral. Las DLPs tienen la función de transcribir el genoma, produciendo los 11 RNA virales. Para el proceso de transcripción son importantes 132 canales que permiten el flujo de material acuoso

y sustratos bioquímicos fuera y dentro de la cápside. (Pesavento *et al.*, 2006; Hoshino y Kapikian, 2000; Mathieu *et al.*, 2001; Jayaram *et al.*, 2004; Estes y Kapikian, 2007; Fauquet *et al.*, 2005). Con respecto a la partícula viral más pequeña de una capa (SLP), presenta un diámetro de 50 nm, y está formada por 120 moléculas de la proteína VP2. En el interior de la capa de VP2 se encuentra interactuando con las proteínas VP1/3 y el genoma. El genoma está formado por 11 moléculas de RNAdc, que se propone que interactúan con 11 de los 12 complejos de VP1/3 que están unidos en la superficie interna de VP2 (Fig. 2) (Pesavento *et al.*, 2006; Hoshino y Kapikian, 2000; Mathieu *et al.*, 2001; Jayaram *et al.*, 2004; Estes y Kapikian, 2007; Fauquet *et al.*, 2005).



Figura 2. Estructura tridimensional de RVA. A) Reconstrucción de TLPs. Las espículas de VP4 se muestran de color naranja y la capa externa de VP7 de color amarillo. B) Corte de una TLPs mostrando la capa intermedia VP6 de color azul y la capa interna VP2 de color verde. C) Corte transversal del centro de RVA mostrando una representación artística de los complejos VP1/VP3 y la organización propuesta del genoma en espiral (Tomado y modificado de Jayaram *et al.*, 2004).

Genoma y proteínas.

Cada segmento de RNAdc es monocistrónico, es decir que codifica para una proteína, excepto el segmento 11 el cual es bicistrónico. En total se codifican 12 proteínas: 6 estructurales y 6 no estructurales (Carter y Saunders, 2007).

Los segmentos de RNAdc tienen entre 667 y 3,302 pb para la cepa SA11. Cabe mencionar que el RNA desnudo no es infeccioso, ya que para transcribirse, su genoma necesita de una RNA polimerasa viral que pueda utilizar RNA como molde y esta actividad enzimática no existe en las células. Mediante comparación de secuencias de todos los segmentos de RNA de varias cepas de RVA, se puede observar que los marcos de lectura abiertos de todos los segmentos genómicos de RVA están flangueados por secuencias no traducidas de longitud variable (extremo 5' de 9-49 nucleótidos y extremo 3' de 17 – 182 nucleótidos) (Fig. 3). La presencia de estas secuencias podrían tener señales relevantes en varios procesos del ciclo replicativo viral (Estes y Kapikian, 2007; Shaw y Greenberg, 1999; Estes y Greenberg, 2013). Se ha propuesto que las secuencias no traducidas de los RNAm de RVA presentan señales de replicación, como demostró Wentz et al. (1996), quien reportó que el RNAm correspondiente al segmento 9 de la cepa OSU requiere los últimos siete nucleótidos del extremo 3' para la síntesis de la cadena complementaria.



Figura 3. Estructura general de un segmento de RVA. El esquema muestra las principales características de los genes de rotavirus. Todos los segmentos genómicos carecen de una señal de poliadenilación, son ricos en A + U, y contienen secuencias conservadas en sus extremos 5'y 3'. Las variaciones conservadas en los extremos se muestran en el esquema. Se incidan los elementos regulatorios en *cis* que son requeridos para la replicación de transcriptos en ensayos de replicación en sistemas libres de células. En el extremo 3'presenta una secuencia potenciadora de la traducción. (Tomado y modificado de Estes y Greenberg, 2013).

Una característica importante del genoma de RVA es la posibilidad de producir rearreglos genéticos durante co-infecciones de la misma célula con dos cepas virales distintas, esto se debe a las posibles combinaciones de diferentes genes parentales, dando lugar a una gran variedad genética (Fig. 4) (Estes y Kapikian, 2007).



Figura 4. Célula polarizada infectada por dos cepas de RVA, las cuales dan origen a dos cepas rearreglantes.

Como se mencionó anteriormente, los viriones están formados por seis proteínas estructurales, que son denominadas con el prefijo VP (de las siglas en inglés: Viral Protein): VP1-VP4, VP6 y VP7. En células infectadas también se generan las proteínas no estructurales que se denominan con el prefijo NSP (de las siglas en inglés: Nonstructural Protein): NSP1-6, y participan en la replicación, regulación de la expresión y morfogénesis de las partículas virales (Fig. 5) (Estes y Kapikian, 2007; Carter y Saunders, 2007).



Figura 5. Separación del ARN genómico y proteínas de RVA mediante geles de poliacrilamida (Tomado y modificado de Mertens *et al.*, s.f.).

Ciclo Replicativo.

Los mecanismos por los cuales el RVA se une y entra a su célula hospedera son complejos y algunos detalles aún se desconocen. Los estudios referentes al ciclo de replicación de RVA se han llevado a cabo en cultivos de células epiteliales de riñón de mono. Las TLPs (los viriones infecciosos) se unen a la célula hospedera por la proteína VP4 de la capa externa (Ludert *et al.*, 1996). La infectividad viral es activada por un corte de la proteína VP4 por enzimas proteolíticas como la tripsina. Los subproductos del corte de VP4, VP8*/VP5* y la proteína VP7 de la capa externa

interactúan con varias moléculas de la superficie celular, iniciando la infección. (Carter y Saunders, 2007). Las primeras interacciones del virión con la célula hospedera son probablemente con receptores que contienen ácido siálico en glicolípidos (Ciarlet y Estes, 1999; Ciarlet *et al.*, 2002; Isa *et al.*, 2006), y se ha visto que algunas cepas reconocen específicamente a la galactosa (Jolly *et al.*, 2001). Posterior a la interacción inicial con ácido siálico se propone que ocurra la interacción con varias integrinas ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$) y la proteína hsc70 actuando como co-receptrores para mediar la internalización del virión (Arias *et al.*, 2001; Arias *et al.*, 2002; López y Arias, 2004).

Durante la entrada del virión a la célula se forma un endosoma vesicular, en donde disminuye la concentración de Ca²⁺ muy probablemente como consecuencia de la acidificación endosomal mediada por una H⁺-ATPasa (Chemello *et al.*, 2002). Cuando las concentraciones de Ca²⁺ en el endosoma son bajas, VP7 y VP5^{*}/VP8^{*} se desensamblan, la membrana del endosoma aparentemente se disuelve por efecto de VP5^{*} (Angel *et al.*, 2008). Sin embargo, otros estudios sugieren una posible participación de tripsina inactiva asociada a la capa externa del virión, al disminuir la concentración de Ca²⁺ en el endosoma la capa externa se solubiliza liberando la tripsina, ésta se activa y se lleva a cabo una proteólisis de la proteína VP7, los subproductos solubilizan la membrana endosomal y liberan las DLPs, las cuales son transcriptacionalmente activas (Benureau *et al.*, 2005). Los productos transcripcionales de cada uno de los 11 segmentos del genoma, en un proceso catalizado por la RNA polimerasa VP1, son 11 copias de RNA de sentido positivo (RNA+), que servirán como RNAm virales o cadenas molde en la replicación del

genoma. Simultáneamente al proceso de transcripción, la proteína VP3 agrega la estructura Cap en el extremo 5´y no se añade cola de poli-A, en el extremo 3´(Carter y Saunders, 2007; Desselberger y Gray, 2009).

Las proteínas virales se acumulan en el citoplasma en regiones electrodensas llamadas viroplasmas. En estas estructuras en forma simultánea con la replicación del genoma viral se ensamblan las SLPs, partículas de una capa compuestas por las proteína VP1, VP2 y VP3, y los RNA virales (Carter y Saunders, 2007; Desselberger y Gray, 2009). Aun no es claro como ocurre la síntesis y el ensamble del genoma viral, algunos modelos sugieren que la síntesis de RNA de sentido negativo (RNA-) se lleva a cabo cuando VP1-VP3 interaccionan con RNA+ y se ensamblan con VP2, formando las SPLs y estimulando la síntesis del RNA-. Después de la replicación del genoma viral, VP6 es añadido a las SLPs formando las DLPs, que a su vez son capaces de iniciar una segunda fase de síntesis de RNA+ también llamada transcripción secundaria. Aunque otros modelos sugieren que primero se forman las SLPs y posteriormente se introducen los RNA+ para su posterior síntesis del genoma viral. (Carter y Saunders, 2007; Desselberger y Gray, 2009; Estes y Greenberg, 2013).

Posteriormente las DLPs geman de los viroplasmas al retículo endoplásmico (RE), portando una membrana lipídica transitoria que contiene a las proteínas virales VP7 y NSP4, y posiblemente VP4. Las proteínas VP7 y NSP4 son sintetizados y Nglicosilados en el RE, donde NSP4 actúa como un receptor intracelular para VP6. Después de unirse NSP4 al virión inmaduro, este se mueve a través de la membrana en una vesícula al interior del RE. En este compartimiento celular, la membrana

transitoria se pierde junto con NSP4 para completar su maduración al incorporar VP7 y VP4 (Carter y Saunders, 2007; Desselberger y Gray, 2009). Los viriones son liberados por lisis en células no polarizadas o son secretadas por la capa apical de células polarizadas como la línea celular de carcinoma de colón de humano (CaCo2) a través de una vía de transporte vesicular no-clásica (Fig. 6) (Desselberger y Gray, 2009; Chwetzoff y Trugnan, 2006; Delmas *et al.*, 2004).



Figura 6. Esquematización del ciclo replicativo de rotavirus. La interacción de VP4 con los receptores celulares, permite la internalización de la partícula viral por endocitosis mediada por receptores. La baja concentración de calcio en el endosoma libera a la partícula viral de su capa externa (VP4 y VP7). Las partículas de doble capa (DLPs) liberadas en el citoplasma son transcripcionalmente activas y producen los RNA de sentido positivo que son utilizados para la producción de proteína viral y como molde de la replicación del genoma viral que es empaquetado en las DLPs, las cuales son recién ensambladas en estructuras virales denominadas viroplasmas que se ubican el citoplasma. Las DLPs se asocian con la proteína viral NSP4, que sirve con un receptor intracelular para favorecer su migración al retículo endoplasmático. Durante este proceso la DLPs adquieren una envoltura que posteriormente la pierden para ensamblar las proteínas de la capa externa (VP4 y VP7), las partículas de tres capas (TLPs) maduras son liberadas por lisis celular o por vía de transporte vesicular no clásica (Tomado y modificado de Estes y Greenberg, 2013).

Dinámica de formación de los viroplasmas.

Los viroplasmas son cuerpos de inclusión citoplasmáticos que se pueden considerar fábricas virales, ya que ahí se replica el genoma viral y se ensamblan las capas proteícas interna e intermedia de los RVA. Además, en los viroplasmas se localizan componentes celulares como tubulina y gotas o cuerpos lipídicos (lipid droplets) (Cheung *et al.*, 2010). Hay evidencia de que NSP2 y NSP5 juegan un papel fundamental en la formación de estas estructuras, ya que al co-expresarlas en células no infectadas se forman estructuras similares a los viroplasmas (VLS) (Fig. 7) (Fabbretti *et al.*, 1999). Así mismo, la reducción de la expresión de NSP5 o NSP2 por RNA de interferencia inhibe la formación de los viroplasmas (Campagna *et al.*, 2005).



Figura 7. Localización intracelular de NSP2 y NSP5 de RVA. Detección de las dos proteínas por microscopia de inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos para NSP2 y NSP5. En células MA104 infectadas con RVA SA11 (a, b), transfectadas con plásmidos para expresar NSP2 (c, d), NSP5 (e, f) o NSP2 y NSP5 (g, h) (Fabbretti *et al.*, 1999).

Las regiones periféricas de los viroplasmas contienen numerosos polisomas, que probablemente son la fuente de producción de proteínas para la maduración del viroplasma (Patton *et al.*, 2006). Se ha observado que el número de viroplasmas decrece conforme pasa el tiempo de post-infección, y simultáneamente presentan un incremento en su área (Fig. 8) (Eichwald *et al.*, 2004).



Figura 8. Cinética de formación de viroplasmas, se grafica el área (círculos blancos) v y número de viroplasmas (círculos negros) a lo largo de 24 horas post-infección (hpi). Cada evaluación corresponde a un promedio de 20 células MA104 infectadas con RVA SA11 (Eichwald *et al.*, 2004).

Estudios recientes explican los cambios en tamaño y número de los viroplasmas, ya que en el curso de la infección en células MA104 se observa un movimiento de viroplasmas hacia la región perinuclear de la célula, y aparentemente en forma simultánea se fusionan entre sí, obteniendo con ello un considerable aumento en su área y una disminución en su número (Fig. 9) (Eichwald *et al.*, 2012).



Figura 9. A) Ensayo de condensación perinuclear de viroplasmas a diferentes hpi en células NSP5-EGFP/MA104 infectadas con RVA SA11. Los viroplasmas fueron detectados con NSP5-EGFP (verde), la membrana plasmática fue teñida con WGA-Alexa 594 (rojo) y el núcleo fue teñido con Hoechst 33342 (azul). Las líneas amarilla, verde y azul representan el área total de la célula, el área de la célula donde los viroplasmas son distribuidos y el núcleo, respectivamente. La escala de la barra es de 10 μ m. B) Gráfico de la condensación perinuclear [V/C relación] (V= área de la célula donde los viroplasmas son distribuidas y C= área total de la célula) determinado a varios tiempos post-infección. Datos son presentados como el promedio \pm error estándar de las medias, n>50 (Eichwald *et al.*, 2012).

La distribución de las proteínas NSP2 y NSP5 dentro de los viroplasmas no es homogénea, ya que la proteína NSP2 se localiza preferentemente en la parte interna y la proteína NSP5 se localiza preferentemente en la parte externa, formando un anillo. En imágenes procesadas en tres dimensiones, se observan los viroplasmas como estructuras aproximadamente esféricas (Eichwald *et al.*, 2004).

La proteína NSP2 es codificada por el gen 8 y está constituida por 317 aminoácidos.

La estructura oligomérica de esta proteína es un homo-octámero, se une a los RNA

de cadena sencilla (RNAcs) de manera inespecífica, tiene función de NTPasa dependiente de Mg⁺² y actividad desestabilizadora de hélice independiente de Mg⁺², por lo que es capaz de separar las estructuras de doble hélice de RNA. Estas propiedades sugieren que el octámero de NSP2 puede servir como un motor molecular, necesario para el empaquetamiento de los RNAm que sirven como cadena molde para la replicación viral ya sea para traslocarlos al interior de las SLPs o para presentar a los RNAm libres de estructura secundaria a la RNA polimerasa VP1. NSP5 es codificada por el gen 11, y está formada por 198 aminoácidos. La estructura oligomérica de NSP5 es homo-dimérica, se une los RNAcs y RNAdc, y sufre modificaciones postraduccionales tales como O-glicosilación y fosforilación por lo que presenta diferentes isoformas fosforiladas de peso molecular aparente entre 26 y 34 kDa. La interacción con NSP2 conduce a NSP5 a una hiperfosforilación (Afrikanova et al., 1996), aunque no es claro si son suficientes estas proteínas virales para que esto ocurra, ya que en otros estudios se muestra que la hiperfosforilacion es consecuencia de quinasas y fosfatasas celulares (Taraporewala y Patton, 2004; Eichwald et al., 2002).

Los viroplasmas no únicamente reclutan a las proteínas de la cápside, también regulan la interacción espacial y temporal de los mismos, de manera que ocurra la replicación y morfogénesis del virus, ya que se ha mostrado que el mal desarrollo y funcionamiento de los viroplasmas provocan el ensamble de partículas vacías (Patton *et al.*, 2006).

Microtúbulos.

Los microtúbulos (MTs) están formados por trece unidades repetidas longitudinalmente llamadas protofilamentos, formadas por las subunidades α y β de tubulina, formando un cilindro hueco y largo de un diámetro de 25 nm. Estos monómeros son encontrados en todos los eucariontes y su secuencia es altamente conservada. Debido a la forma en cómo son intercaladas las subunidades de tubulina, cada protofilamento tiene una dirección. Como todos los protofilamentos tienen la misma orientación, un extremo está determinado por la ubicación de α -tubulina y el otro extremo por β -tubulina. Debido a esta característica, los MTs presentan polaridad, siendo el lado en donde se encuentra β -tubulina el extremo más (+) en donde se lleva más rápido el crecimiento y donde se encuentra la α -tubulina el extremo menos (-) (Fig. 10). Esta orientación determina que los dos extremos de cada polímero sean distintos, de manera que tienen un efecto muy importante en las velocidades de crecimiento y acortamiento de los filamentos (Alberts *et al.*, 2002; Lodish *et al.*, 2005).

Cada subunidad del dímero de tubulina puede unirse a una molécula de GTP. En la subunidad α tubulina, la molécula de GTP queda atrapada físicamente en la interfase del dímero y nunca se hidroliza o es expulsada. En contraste, en la subunidad β -tubulina puede encontrarse tanto en forma de GTP como de GDP y puede ser hidrolizada. Cuando los heterodímeros de tubulina se ensamblan, se forman dos tipos de contactos de proteína-proteína. A lo largo del eje longitudinal del microtúbulo, la cabeza de una molécula de β -tubulina se une con la cola de la molécula de α -tubulina del dímero adyacente. Perpendicularmente a estas

interacciones se forman contactos laterales entre protofilamentos vecinos. Estos contactos laterales principales se forman entre monómeros del mismo tipo (α - α , β - β). Ambos tipos de contactos se repiten en la lámina helicoidal regular de MTs (Fig. 10) (Alberts *et al.*, 2002; Lodish *et al.*, 2005).



Figura 10. Estructura de los MTs. Se muestra la estructura tridimensional de un dímero de tubulina y su organización para formar los protofilamentos. La unión de estos protofilamentos dará origen a una estructura tubular hueca conocida como MT (Lodish *et al.*, 2005).

Durante la polimerización de los MTs, la adición de nuevos dímeros esta modulada por la hidrólisis de GTP. Cuando el GTP se hidroliza, si la adición de dímeros es rápida, se forma en el extremo (+) un casquete de β -tubulina unida a GTP, mientras que, de ser lenta, lo que se expone es tubulina unida a GDP. Esto se debe a la unión de una u otra forma de β -tubulina determina la velocidad de polimerización y despolimerización del microtúbulo (MT). De esta forma, se propone que el extremo (+) con GTP favorece la elongación, mientras que uno de GDP la despolimerización (Fig. 11) (Alberts *et al.*, 2002; Lodish *et al.*, 2005).

Las heterodímeros de tubulina funcionan como enzimas que catalizan la hidrólisis de GTP. Para las subunidades libres esta hidrólisis ocurre muy despacio, sin embargo, se aceleran cuando las subunidades se incorporan a los filamentos. Justo después de la incorporación de la subunidad, el grupo fosfato libre se libera de cada subunidad, pero el nucleósido difosfato permanece en la estructura del filamento entre dos subunidades vecinas. Así, pueden existir dos tipos diferentes de estructuras, una con la "forma T" con GTP unido, y otra con "forma D" con GDP unido. Estas estructuras son importantes en la velocidad de polimerarización y despolimerización, las cuales también dependerán de las concentraciones libres de las subunidades de tubulina. La rápida interconversión entre un estado de crecimiento y otro de acortamiento, con una concentración subunidades libres, se denomina inestabilidad dinámica. El cambio a un acortamiento rápido se llama catástrofe, y el cambio hacia el crecimiento, rescate (Fig. 11) (Alberts *et al.*, 2002).



Figura 11. La hidrólisis de GTP después de la polimerización desestabiliza a los MTs. Análisis del crecimiento y la contracción de los MTs *in vitro* sugiere el siguiente modelo para la inestabilidad dinámica. (A) Adición de heterodímeros de tubulina que transportan GTP hasta el final de un protofilamento provocan un crecimiento de conformación lineal que rápidamente se empaqueta en la pared de los MTs, estabilizando la estructura. La hidrólisis de GTP después del ensamble provoca un cambio conformacional de las subunidades y tiende a forzar al protofilamento a adquirir una estructura curva que es menos capaz de empaquetarse en la pared de MTs. (B) En un microtúbulo intacto, los protofilamentos hechos de subunidades conteniendo GDP son forzados a mantenerse en la conformación lineal por algunos puentes laterales con la pared del microtúbulo, especialmente estables por la presencia de subunidades con GTP (GTP cap) en uno se los extremos. La pérdida de GTP cap lleva a los protofilamentos que contienen GDP a relajar la estructura y a adquirir una estructura curva. Esto llevara a una progresiva despolimerización de los MTs y eventualmente a un desensamble de los protofilamentos en dímeros de tubulina libres (Alberts *et al.*,2002).

Para los MTs, la diferencia estructural entre el extremo en forma T y los extremos en forma D es muy grande. Las subunidades de tubulina con el GTP unido al monómero β producen protofilamentos rectos que forman contactos laterales regulares fuertes con otras subunidades. Sin embargo, la hidrólisis de GTP a GDP está asociada a un sutil cambio conformacional de la proteína que curva los protofilamentos. En un MT que esté creciendo rápidamente, el extremo GTP constriñe la curvatura del protofilamento y el extremo parece recto. Sin embargo, cuando las subunidades han hidrolizado sus nucleótidos, esta constricción no se produce y aparece el extremo curvado. Esta liberación cooperativa de la energía de hidrólisis almacenada en el MT produce un rápido desprendimiento de los MTs, y aparecen anillos y oligómeros curvados de tubulina unida a GTP cerca de los MTs en despolimerización (Alberts *et al.*, 2002).

Existe otra tubulina denominada γ , esta proteína está presente en menor concentración que las otras dos, está implicada en el crecimiento de los MTs. Generalmente los MTs se nuclean a partir de una localización intracelular llamada centro organizador de MTs (MTOC, de microtubule-organizing center). El extremo (-) es el extremo que tiene contacto con el MTOC, de forma que su extremo (+) va creciendo a partir de esta estructura generando diferentes tipos de disposición de MTs. Se ha aislado un complejo de tubulina γ en forma de anillo (γ -TuRC, de tubulin ring complex) que en ensayos in vitro es un nucleador de MTs extraordinariamente eficiente (Alberts *et al.*, 2002; Lodish *et al.*, 2005).

Los MTs tienen un papel importante en la organización de la célula a través del MTOC, localizado en la periferia del núcleo. El MTOC dirige el ensamble y orientación de los MTs, ya que estos se mantienen anclados de su extremo (-) en el MTOC, esto permite el trasporte y la dirección del tráfico vesicular y la orientación

de los organelos, con ayuda de la proteínas motoras como son: las quinesinas y los complejos de dineína (Fig. 12) (Alberts *et al.*, 2002).



Figura 12. Organización y desplazamiento de las proteínas motoras de los MTs (Hirokawa, 1998).

Complejo motor de dineína.

Las proteínas motoras se unen a los filamentos polarizados del citoesqueleto y utilizan la energía derivada de ciclos repetidos de hidrólisis del ATP para desplazarse sobre ellos. Muchas proteínas motoras transportan organelos rodeados de membrana a sus localizaciones en la célula. Otras proteínas pueden producir deslizamientos de unos filamentos del citoesqueleto contra otros, generando fuerzas que permiten fenómenos como la contracción muscular, el batido de los cilios o la división celular. En los MTs existen dos proteínas motoras que participan en el trafico celular, las quinesinas que se desplaza hacia el extremo (+) y el complejo motor de dineína (CDM) citoplasmática que se desplaza al extremo (-) (Fig. 12) (Alberts *et al.*, 2002; Lodish *et al.*, 2005).

Los complejos motores de dineínas son conservadas evolutivamente, estos motores moleculares se clasifican con base a su función en dos grupos: el axomal y dineína

citoplasmática. La dineína axomal es requerida para regular la movilidad de los cilios y flagelos de las células eucariontes (D'Ambrosio, 2010). Las otras formas de dineínas son denominadas dineínas citoplasmática 1 y 2. La dineína citoplasmática 2 es expresada en células ciliadas, tiene un papel en el transporte intraflagelar, y en un proceso necesario para el ensamble ciliar/flagelar. La más abundante dineína citoplasmática 1 es ubicuamente expresada en varios tejidos del humano y es crítica para algunas funciones celulares como son la localización de algunos RNAm, la ruptura de la envoltura nuclear, la organización del huso mitótico, migración del núcleo durante la mitosis, transporte de organelos y preservar la organización del RE y aparato de Golgi (D'Ambrosio, 2010; Pfister *et al.*, 2006; Wadzinski, 2006).

Cadena Pesada de Dineína.

El motor de dineína citoplasmática 1 está hecho por varias subunidades formando un complejo, el ensamble consta de homodímeros de las cadenas pesadas, intermedias, ligeras intermedias y tres clases de cadenas ligeras (Kuta, 2011). Las cadenas pesadas de dineína (DHC), es codificada por el gen *DYNC1H1*, es la subunidad del complejo más grande y generan la fuerza mecánica a través de la hidrólisis de ATP. Cada cadena DHC tiene aproximadamente 4,600 aminoácidos, un peso molecular de 530 kDa y fue clasificado en la familia de <u>A</u>TPasas <u>A</u>sociadas a varias <u>A</u>ctividades celulares (AAA) (D´Ambrosio, 2010; Kuta, 2011). El extremo carboxilo de la DHC contiene un dominio motor de seis AAA, conocido como cabeza que tiene forma de anillo, sin embargo únicamente cuatro son catalíticos (AAA1-AAA4). Presenta también estructuras denominadas: pedúnculo, conector y cola que han sido implicados en el movimiento a través de los MTs (Kuta, 2011). La estructura denominada pedúnculo es una prolongación que sobresale de los dominios AAA4 y AAA5 (D'Ambrosio, 2010) y cuenta con un dominio de unión a los MTs. La región amino denominada cola está conectada al dominio AAA1 por el dominio conector, la cola forma la plataforma donde se unen las demás subunidades (Pfister *et al.*, 2006), así como el dominio de dimerización y unión al complejo de dinactina (CD) (Fig. 13) (D'Ambrosio, 2010).



Figura 13. Esquematización del dímero DHC. El extremo amino presenta el domino de dimerización y el extremo carboxilo el dominio motor compuesto de un anillo de 6 dominios AAA, del cual se prolonga el dominio de unión a los MTs (Kardon y Vale, 2009).

Cadenas intermedias de dineína.

Las cadenas intermedias de dineína (DIC) 1 y 2 presentan un peso molecular de 74 kDa y cada cadena es codificada por separado por los genes de la familia *DYNC111* y *DYNC112* (Wadzinski, 2006). Las secuencias de aminoácido de ambas cadenas son altamente similares y en su estado nativo se encuentran como dímeros. Las DIC no solo están asociadas con las DHC, también con las cadenas ligeras y adaptadores complejos (Kuta, 2011). Estas estructuras son las subunidades más versátiles, debido a su expresión diferencial y modificaciones postraduccionales.

Existen 6 isoformas de cada gen debido a procesos de splicing alternativos. La fosforilación de diferentes residuos de la DIC podría ser una forma de regular su interacción con el CD, organelos, segregación de cromátidas y con vesículas para su tráfico intracelular (Fig. 14) (Kuta, 2011).

Cadenas intermedias ligeras de dineína.

Similar a las DIC, los genes *DYNC1LI1 y DYNC1LI2* codifican las cadenas intermedias ligeras DLIC1 y DLIC2 respectivamente, con un peso molecular entre 50-65 kDa. La región amino de homodímeros de DLIC se unen a la DHC. En algunos sistemas experimentales mostraron una interacción directa con varias proteínas, aportando evidencia de su papel en la selección de carga. El patrón de la expresión de las DLIC no es uniforme, los transcritos de *Dync1li1* en su mayoría fueron detectados en tejido neural, corazón y riñón, mientras que *Dync1li2* estuvo presente en cerebro, tejido adiposo, musculo, bazo, testículos y hueso. Además también pueden estar fosforiladas (Fig. 14) (Kuta, 2011; Wadzinski, 2006).

Cadenas ligeras de dineína.

Las cadenas ligeras de dineina (DLC) son los únicos componentes del complejo de dineína, que también se encuentran en otros procesos independientes de dineína. Estos se encuentran como homodímeros *in vivo,* y se ha propuesto, que pueden actuar como estabilizadores en la dimerización de las demás cadenas del complejo adaptadoras de 8-10 kDa que podrían permitir las interacciones específicas con diferentes cargas a transportar. Hay tres subfamilias de las DLC: la familia asociada

al complejo T (TCTEX), Roadblock (ROBL) y LC8. Cada una de estas familias consta de al menos de dos genes (Fig. 14) (Wadzinski, 2006).

TCTEX.

Las proteínas DYNLT1-5 (conocidas como TCTEX1-5 respectivamente) se unen directamente a las DIC (Kuta, 2011; Dahl y Baher, 2021; Braschi, *et al.*, 2022). La familia TCTEX ha mostrado una interacción con varias proteínas de canales iónicos, receptores, virus y pigmentos proteícos. La proteína DYNLT1 ha sido reportada en la remodelación de actina (Fig. 14) (Wadzinski, 2006; Braschi, *et al.*, 2022).

LC8.

Las proteínas DYNLL1, DYNLL2 y DNAL4 están pobremente asociadas con el CDM y pueden ser encontradas como moléculas libres en el citoplasma (Kuta, 2011; Braschi, *et al.*, 2022). También se encontró que DYNLL interacciona con cargas no asociadas al CMD o del transporte independiente de MTs (Fig. 14) (Pfister y Lo, 2012). Las DLC de la familia LC8 estas presentes en algunas enzimas incluyendo miosina V y óxido nítrico sintetasa. También juegan un papel en la regulación de la apoptosis a través de una interacción con las proteínas de la familia BCL2 (Braschi, *et al.*, 2022)

ROBL.

Las proteínas DYNLRB1 y DYNLRB2 (conocidas como Robl1 y Robl2) se unen a la DIC también como dímero, sin embargo no se conoce mucho acerca de sus funciones. Estudios de expresión revelaron que el RNAm de *DYNLRB1* es encontrado en todos los tejidos humanos, mientras que el RNAm de *DYNLRB2* es restringido a ciertos tejidos incluyendo riñón y testículos. Recientes análisis

estructurales del complejo DYNLRB y DIC, revelaron que la DIC sufre un reordenamiento con la unión de DYNLRB, sugiriendo que esta última es capaz de estabilizar el fragmento de la DIC en solución (Pfister y Lo, 2012). La proteína DYNLRB1 interactúa con proteínas miembros de la familia Rab6 en el aparato de Golgi (Fig. 14) (Braschi, *et al.*, 2022).

A diferencia de DYNLL y DYNLT, la función de DYNLRB en el CMD no es clara. Mutaciones del gen *DYNLRB* resultan en defectos mitóticos, acumulación de la cargas axomales, sugiriendo que DYNLRB es significativamente importante en montaje y regulación del CMD (Pfister y Lo, 2012).



Figura 14. Esquematización del Complejo Motor de Dineina, formado por dos cadenas pesadas (DHC) que se homodimerizan en el extremo amino y los dominios motores están en el extremo carboxílico, las grandes cabezas globulares que están compuestas por un anillo de dominios AAA (numerados del 1 al 6). El dominio AAA 1 es el sitio de hidrólisis de ATP. El dominio de unión a microtúbulos es una proyección que se encuentra en el lado opuesto del anillo entre los dominios AAA 4 y 5. En el extremo amino de DHC, se ubican dos cadenas intermedias (IC) y cadenas intermedias ligeras (LIC). Los dímeros de las tres familias de cadenas ligeras (LC) se unen a los dímeros de IC. (Yadav y Linstedt, 2011).

Gen		Proteína	Nombre de proteínas comunes		
Humano	Ratón	Humano y ratón	Humano y ratón		
Complejo de dineína citoplasmática 1					
DYNC1H1	Dync1h1	DYNC1H1	Cadena pesada de dineína citoplasmática 1, cadena pesada de dineína		
			convencional citoplasmática, DHC1a, dineína 1, cadena pesada de dineína 1,		
			MAP1C.		
DYNC1I1	Dync1i1	DYNC1I1	Cadena intermedia de dineína citoplasmática 1, IC-1, IC74-1, IC-70.		
DYNC1/2	Dync1i2	DYNC1I2	Cadena intermedia de dineína citoplasmática 2, IC-2, IC74-2.		
DYNC1LI1	Dync1li1	DYNC1LI1	Cadena intermedia ligera 1 de dineína citoplasmática 1, LIC1.		
DYNC1Ll2	Dync1li2	DYNC1LI2	Cadena intermedia ligera 2 de dineína citoplasmática 1, LIC2.		
DYNLT1	Dynlt1	DYNLT1	Cadena ligera 1 de dineína Tctex dineína 1, Tctex1.		
DYNLT2	Dynlt2	DYNLT2	Cadena ligera de dineina Tctex tipo 2		
DYNLT3	Dynlt3	DYNLT3	Cadena ligera 3 de dineína Tctex 1, rp3.		
DYNLT4	Dynlt4	DYNLT3	Cadena ligera de dineina Tctex tipo 4		
DYNLT5	Dynlt5	DYNLT3	Cadena ligera de dineína Tctex tipo 5.		
DYNLRB1	Dynlrb1	DYNLRB1	Cadena ligera 1 de dineína roadblock, Robl1.		
DYNLRB2	Dynlrb2	DYNLRB2	Cadena ligera 2 de dineína roadblock, Robl2.		
DYNLL1	Dynll1	DYNLL1	Cadena ligera 1 de dineína LC8.		
DYNLL2	Dynll2	DYNLL2	Cadena ligera 2 de dineína LC8.		
DNAL4	Dnal4	DNAL4	Cadena ligera 4 de dineína axonemica		
Complejo de dineína citoplasmática 2					
DYNC2H1	Dync2h1	DYNC2H1	Cadena pesada de dineína citoplasmática 2, cadena pesada dineína IFT, DHC1b,		
			cadena pesada 2 de dineína, DHC2.		
DYNC2LI1	Dync2li1	DYNC2LI1	Cadena intermedia ligera 1 de dineína citoplasmática 2, D2LIC, LIC3		

Tabla 1. Subunidades de la CMD (Tomada y modificada de Pfister, 2005 y Braschi, et al., 2022).

Complejo de Dinactina.

El complejo de dinactina (CD), de aproximadamente 1.2 Mda, es necesario para todas las funciones del CMD. El CD ayuda a orientar al CMD a determinadas localizaciones celulares, enlaza al CMD a la carga e incrementa la procesividad, aunque todavía no se ha establecido un modelo completo de cómo estas actividades son integradas. El CD contiene 11 diferentes subunidades polipeptídicas, algunos polipéptidos están presentes en más de una copia por

complejo. Las partes principales del CD es un octámero que forma un filamento corto de la proteína relacionada a actina 1 (ARP1) que sirve como andamio y ayuda a enlazar al CMD a la carga a través de su interacción con espectrina que recubre la cara que da hacia el citoplasma en varias organelos celulares. En uno de los extremos de ARP1 termina con la proteína caperuza de actina (CapZ α/β heretodímero), sugiriendo una estructura similar al extremo (+) de un filamento de actina. En el extremo opuesto de ARP1 lo cubre una segunda proteína relaciona a actina (ARP11) y la subunidad p62, esta última se asocia con dos subunidades p25 y p27 (Kardon y Vale 2009; Allan, 2011; Schroer, 2004). El CD presenta una extensión que se denomina brazo en donde se encuentra un dímero de la subunidad p150 Glued, que contiene un motivo CAP-Gly en el extremo amino que se une a los MTs *in vitro* e *in vivo*, interacción que es necesaria para aumentar la procesividad del CMD. También se une a la DIC del CMD (Schroer, 2004). La interacción del filamento de ARP1 y el brazo de p150 involucra a p50 (dinamitina) y la subunidad p24. El CD presenta cuatro copias de p50 que se asocian entre si y tienen un papel fundamental en su estabilidad y estructura. En el caso de sobreexpresión de p50 el CD es desintegrado, debido al posible desplazamiento de p150^{Glued} y p24 de la estructura del CD (Fig. 15) (Allan 2011; Jacquot, 2011; Schroer, 2004).



Figura 15. Esquematización de la localización y aproximación de las subunidades del complejo de dinactina (Jacquot, 2010).

Movimiento intracelular viral asociada al CMD.

El ciclo replicativo viral es dependiente de un sin número de funciones celulares. La interacción con el citoesqueleto es comúnmente necesaria para iniciar la infección, tráfico de los componentes virales y ensamblar a las nuevas partículas virales. Los virus son parásitos obligados, porque sus genomas no codifican para todas las proteínas necesarias para la replicación del genoma viral y reproducción de partículas virales funcionales. Sin embargo, aun con su pequeño repertorio de proteínas, estos deberían todavía de ser capaces de manipular las funciones celulares necesarias de su hospedero para lograr la producción de la nueva progenie (Greber y Way, 2006; Hsieh *et al.*, 2010).

Durante el ciclo replicativo viral, algunos virus se propagan de célula a célula, lo cual requiere un movimiento a través del citoplasma. Este movimiento puede ser un problema, sencillamente por el tamaño del virus o de sus componentes y la alta densidad del citoplasma que se opone a un eficiente movimiento direccional por
libre difusión. Por ejemplo; se ha calculado que la cápside del virus herpes simplex le podría tomar 231 años en a travesar por 1 cm del citoplasma axonal sin ayuda de las proteínas motoras, pero si es transportado por dichas proteínas le llevaría aproximadamente 2-3 hrs (Sodeik, 2000). Es así que los virus han evolucionado un eficiente mecanismo al secuestrar el sistema de transporte celular de su hospedero. Los mecanismos de interacción de algunos virus y el citoesqueleto del huésped y sus cofactores varía dependiendo de la especie de virus (Fig. 16) (Greber y Way, 2006; Hsieh *et al.*, 2010).



Figura 16. Modelo de transporte retrógrado viral. La entrada de la partícula viral a través del endosoma (A, C) o la fusión directa de la envoltura viral en la membrana plasmática (B) llevan a un transporte retrógrado a lo largo de los MTs usando el CMD. Las cápsides virales pueden ser asociadas directamente (A) o un receptor celular puede unirse simultáneamente a una proteína viral y al CMD (C). Después llegan a MTOC en el extremo menos de los MTs y el virus se dirige a sus sitios de replicación, producción y ensamble de las nuevas proteínas virales (D) como son el núcleo o las fabricas virales. La partículas ensambladas pueden ser transportadas hacia la periferia celular por un transporte anterógrado (Merino-Gracía *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que las proteínas motoras como el CMD están involucradas en el ciclo replicativo de algunos virus, por ejemplo, en células infectadas con hantavirus la despolimerización de los MTs con nocodazol o la transfección de células con un plásmido para sobreexpresar p50 que actúa como una dominante negativa que inhibe la función del CMD, afectan el trasporte intracelular de la proteína viral N reduciendo su acumulación e interacción con el compartimiento intermedio RE-Golgi en la región perinuclear y reducen la replicación del RNA viral (Fig. 17) (Ramanathan *et al.*, 2007; Ramanathan y Jonsson, 2008). En células infectadas con herpes simplex, la sobreexpresión de p50 provoca una disminución en el transporte de su cápside a la región perinuclear, además de una inhibición de la síntesis viral en células infectadas, a pesar de que la unión a la membrana celular, internalización y la organización de la red de MTs no fue afectada (Fig. 18) (Döhner *et al.*, 2002).



Figura 17. Sobreexpresión de p50 (verde) interrumpe la acumulación de la proteína viral N (rojo) en la región perinuclear en células infectadas con hantavirus. Células Vero E6 infectadas con hantavirus son mostradas: control (panel izquierdo), células tratadas por 1 hr con nocodazol (panel central) y co-transfectadas con un plásmido para expresar p50-GFP (panel derecho) (Ramanathan *et al.*, 2007).



Figura 18. La sobreexpresión de p50 (dinamitina) en células PtK_2 reduce el transporte de la cápside del virus herpes simplex al núcleo. A 3 hrs después de la infección de células PtK_2 más cápsides fueron encontrados en el núcleo de células no transfectadas (a-c) y en células sobreexpresando GFP (c). En células p50 (a) o p50-GFP, solo una pocas cápsides alcanzaron el núcleo y varias cápsides fueron observadas en la periferia de la célula (flechas en a y b, paneles de abajo) (Döhner, 2002).

En otros casos, se conoce la proteína viral y la cadena del CMD que llevan a cabo la interacción, como el virus de la fiebre porcina africana (ASFV), el cual la proteína viral p54 interacciona con LC8 de dineína, ambas proteínas se localizan en los MTOC. En células Vero infectadas con ASFV la sobreexpresión de p50 aborta el proceso infectivo, interrumpiendo así la expresión de las proteínas virales, lo que demuestra un papel esencial del CMD durante la infección viral. La proteína viral p54 de ASFV se ubica en la membrana externa del virión y participa en los primeros estadios de la infección. Por lo que se ha propuesto que la unión de estas proteína al CMD puede constituir un mecanismo molecular para el transporte viral (Fig. 19) (Alonso *et al.*, 2001).



Figura 19. La interrupción de la función del CMD resulta en la inhibición de la infección por parte de ASFV. (a, c, d y e) Células Vero fueron transfectadas para sobreexpresar p50 en rojo. (b, c, d y e). Posteriormente las células fueron infectadas con ASFV, y se detectaron las proteínas virales p30 (c), p54 (b y d) p72 (e) en verde. Las células transfectadas no expresaron las proteínas virales, la colocalización de las proteínas virales y p50 no fue encontrada (Alonso *et al.*, 2001).

Pero el transporte viral no solo se puede dar con la interacción directa de proteínas virales con alguna subunidad del CMD, también se puede llevar a cabo mediante la interacción de alguno de sus complementos como en el caso de citomegalovirus

humano, en el que la proteína estructural viral pp150 interacciona con Bicaudal D1 (BicD1) que es una proteína celular que sirve como adaptador del CMD para seleccionar cargas específicas, la interacción de pp150-BicD1 favorece que pp150 se concentre en los compartimientos de ensamble en células infectadas. La inhibición de la expresión de BicD1 por shRNA llevó a un bajo rendimiento de partículas virales infecciosas, y el mismo resultado se obtuvo cuando se sobreexpresó p50, sugiriendo que la morfogénesis y ensamble viral es dependiente del CMD (Fig. 20) (Indran *et al.*, 2010). En la tabla 2 se resumen las interacciones de otras partículas virales con el CMD.



Figura 20. 1) La red de MTs y el movimiento dependiente de dineína es requerido en la integridad estructural de los compartimientos de ensamble viral (CEV) de citomegalovirus humano. Fibroblastos de humano fueron infectadas con citomegalovirus y tratadas con nocodazol a los 5 días post-infección. Cosechadas a los 30 y 90 min después del lavado de nocodazol (a-c), la localización de los CEV fue realizada ubicando la proteína viral pp150 en rojo, también se detectó a β-tubulina en verde y el núcleo en azul. La sobreexpresión de p50 (dinamitina en verde) provocó una redistribución de los CEV (pp150 en rojo) (d-f). 2). Las células HFF fueron electroporadas con shRNA para abatir la expresión de BicD1 (b) o con un control shRNA (a), y después de un día se infectaron con citomegalovirus humano y se observaron a 5 días post-infección. En shRNA control, los CEV en rojo (pp150) se mantienen en la periferia nuclear y con una estructura definida (a). En el caso de shRNA BicD1, los CEV se presentan de forma difusa (b). Las células transfectadas sobreexpresan GFP (Indran *et al.*, 2010).

Tabla 2. Proteínas virales que interactúan con el CMD (Greber y Way, 2006; Hsieh *et al.*, 2010; Leopold y Pfister, 2006).

Virus	Receptor celular		Receptor Viral	
Familia				
Adenovirus tipo 2 y 5.	Dineína: Cadena ligera	е	Proteína hexon de la	
Adenoviridae.	intermedia		cápside	
Parvovirus canino (CPV)	Dineína Proteína de la cápside		Proteína de la cápside	
Parvoviridae				
Influenza X-31	Dineína Desconocido			
Orthomyxoviridae				
Human foamy virus (HFV)	Dineína: Cadena ligera (LC8)		Proteína Gag de la cápside	
Retroviridae				
Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV)	Dineína/dinactina Proteína Gag de la cápside			
Retroviridae				
Inmuno deficiencia humana tipo 1	Dineína		Complejo de transcripción	
(HIV1)			reversa (RTC)	
Retroviridae				
Coxsackievirus	Bicaudal D1 (BicD1)*		Proteína de la cápside	
Picornaviridae				
Pseudorabies (PRV)	Dineína/dinactina		Proteína UL37	
Herpesviridae				
Rabia (RV)	Dineína: Cadena ligera (LC8)		Complejo de la polimerasa	
Rhabdoviridae			de la fosfoproteína P	
Mokola	Dineína: Cadena ligera (LC8)		Complejo de la polimerasa	
Rhabdoviridae			de la fosfoproteína P	
Vaccinia (VACV)	Dineína		A27L	
Poxviridae				
Papilomavirus	Dineína		Proteína L2	
Papilomaviridae				

*Proteína asociada a dineína

Ciliobrevina es un compuesto que fue recientemente descrito como un inhibidor específico de la ATPasa del CMD (Firestone *et al*, 2012), debido a esto existen pocos estudios referente al efecto que podría tener este compuesto sobre los cuerpos de inclusión que forman algunos virus en células infectadas, principalmente aquellas que se desplazan hacia la región perinuclear. En fibroblastos de humano

infectadas con citomegalovirus, donde se utilizó Ciliobrevina A (molécula análoga a Ciliobrevina D), se observó una alteración en la formación de los compartimientos de ensamble citoplasmáticos virales que se ubican principalmente en la región perinuclear, una estructura más dispersa en el citoplasma, aunque no se analizó más a fondo como afecta esto al ciclo replicativo viral de este virus (Fig. 21) (Clippinger y Alwine, 2012).



Figura 21. La inhibición de la función del CMD usando ciliobrevina A afecta la formación de los compartimentos de ensamble citoplasmáticos virales. Fibroblastos de humano fueron infectados con citomegalovirus y fijados a las 48 o 72 horas, o tratados con ciliobrevina A entre las 48 y 72 horas y posteriormente fijados. El análisis de inmunoflourescencia para la proteína viral pp28 (verde), la proteína celular mTOR (rojo) y núcleo (azul) son mostrados. El citomegalovirus usado codifica la GFP, así las células infectadas son indicadas en el panel GFP (verde). Esto permite que las células no infectadas (flechas) sean vistas como un control interno (Clippinger y Alwine, 2012).

También se ha reportado que las proteínas E1 y E4 de papilomavirus humano tipo 18 forman estructuras similares a agresomas cuando son coexpresadas y se ubican en los MTOC que se encuentran próximos a la región perinuclear. El tratamiento con ciliobrevina D en células trasnfectadas para sobreexpresar las proteínas virales E1 y E4 afecta el ensamble de estas estructuras, lo que sugiere que los agresomas formados por estas proteínas virales fueron ensamblados por un transporte retrogrado dependiente del CMD a lo largo de la red de los MTs (Fig. 22). Además se observó que algunas oncoproteinas que eran secuestradas por los agresomas formados por las proteínas E1 y E4 disminuyeron su concentración en estas estructuras virales cuando eran tratadas con nocodazol (Kajitani *et al.*, 2013).



Figura 22. El transporte dependiente del CMD a través de los MTs fue requerido para el ensamble de los agresomas E1/E4. Las células HeLa fueron transfectadas con el plásmido FLAG-18E1*E4, después de 24 horas fueron tratadas con Ciliobrevina D y fijadas a las 24 horas del tratamiento. El análisis de inmunoflourescencia para 18E1*E4 (anticuerpo anti-FLAG en rojo) y núcleo (azul) son mostrados. Los controles son mostrados como células no transfectadas. La ciliobrevina D previene el ensamble de los agresomas 18E1*E4 (Kajitani *et al.*, 2013).

Antecedentes: Asociación de viroplasmas de RVA con la red de MTs.

Una de las primeras indicaciones de la posible asociación de los viroplasmas de RVA se hizo en células Caco-2 no diferenciadas infectadas con la cepa RRV de RVA, donde se observó una desorganización en la red intracelular de vimentina, mientras que en las células diferenciadas se visualizó un desensamble de los MTs dependiente de las concentraciones de Ca² (Brunet *et al.*, 2000).

También se han observado por microscopia de epifluorecencia que las proteínas de los viroplasmas de RVA se encuentran aparentemente asociadas a componentes de los MTs. La utilización de nocodazol para despolimerizar los MTs inhibe el crecimiento de los viroplasmas en células MA104 infectadas con la cepa SA11 de RVA. Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación se encontró una asociación de NSP2 con tubulina, concluyendo que la red de MTs es necesaria para el crecimiento de estos (Cabral-Romero y Padilla-Noriega, 2006).

En estudios de interacción de proteínas se encontró que la proteína NSP2 se asocia con dímeros de tubulina y que en células MA104 infectadas con RVA de bovino (RF) causa una despolimerización de los MTs asociada a la formación de gránulos de tubulina que se localizan en los viroplasmas. La sobreexpresión de NSP2 produce un efecto similar en la red de los MTs, NSP2 despolimeriza MTs y lleva a la formación de gránulos de tubulina. Esta despolimerización probablemente reorganiza las rutas de la maquinaria celular para inhibir el tráfico y funciones que podrían participar en defensa de las infecciones virales (Martin *et al.*, 2010).

Estudios en células MA104 infectadas con RVA de las cepas de SA11 u OSU se induce una acetilación de tubulina, provocando la estabilización de la red de MTs, mediante inmunofluerescia se observa la colocalización de los viroplasmas con estas regiones enriquecidas de MTs acetilados, por lo cual estas regiones de MTs podrían estar involucrados en la estructura y dinámica de viroplasmas. En células MA104 infectadas con RVA SA11 se ha descrito que existe un desplazamiento de los viroplasmas hacia la región perinuclear que depende de la red de MTs, ya que esta migración se ve afectada por el uso de nocodazol. Por otro lado, se ha

propuesto la partición de las proteínas virales NSP2 y VP2 en la dinámica de viroplasmas. Usando células MA104/NSP5-GFP que expresan la proteína viral NSP5 fusionada a GFP se transfectaron con un vector viral de Herpes Simplex Tipo 1 (HSV-1) para expresar las proteínas virales NSP2 o VP2 deletado en 90 aminoácidos (Δ92VP2), induciendo a la formación de VLS, VLS(NSP2)i o VLS(Δ92VP2)i respectivamente. Cuando estas células fueron tratadas con nocodazol una hora antes de fijarlas (24 horas post-infección) las VLS(NSP2)i y VLS(Δ92VP2)i parecieron ser sensibles a la droga. El número de VLS(NSP2)i aumento con respecto al control, mientras que la proporción perinuclear no fue afectada. Caso contrario con las VLS(Δ92VP2)i, donde se observa que la proporción perinuclear es mayor que el control, pero el número de estas estructuras no se vio afectada. Estos datos nos sugieren que ambas proteínas virales, NSP2 y VP2, podrían participar en la dinámica de viroplasmas (Eichwald *et al.*, 2012).

Un dato sorpresivo fue el que se obtuvo al inhibir la quinesina 5 (Eg5), una proteína motora que presenta un movimiento anterógrado, con monastrol, un inhibidor alostérico de la familia de la quinesina Eg5, que afectó el desplazamiento de los viroplasmas hacia la región perinuclear, aunque no se descarta que otras proteínas motoras, como el CMD participen en este proceso (Eichwald *et al.* 2012).

El uso de los MTs y el desplazamiento hacia la región perinuclear de los viroplasmas, nos podría sugerir que las proteínas motoras están involucradas en particular el CMD. Por tal motivo, nos propusimos estudiar el papel del CMD en la dinámica de los viroplasmas en células BSC1 infectadas con RVA SA11.

Hipótesis.

Al inhibir la función del Complejo Motor de Dineína (CMD) se afectara la migración intracelular de viroplasmas de Rotavirus A SA11 hacia la región perinuclear en células BSC1 de mamífero.

Objetivo general.

Estudiar el papel del Complejo Motor de Dineína en la migración intracelular de los viroplasmas de RVA.

Objetivos particulares.

- Estudiar la distancia de los viroplasmas al núcleo celular, su tamaño y número en la cepa SA11 de RVA durante el proceso de infección en células BSC1 a 6, 10, 14 y 18 horas post-infección (hpi).
- Determinar el efecto de la sobreexpresión de p50 en los viroplasmas en cuanto a su distancia al núcleo celular, su tamaño y su número en células BSC1 infectadas con RVA SA11.
- Determinar el efecto del inhibidor de Ciliobrevina en la función del Complejo Motor de Dineína en cuanto a la distancia al núcleo celular, su tamaño y su número de viroplasmas en células BSC1 infectadas con RVA SA11.

Materiales y métodos.

• Línea celular.

Se utilizaron las líneas celulares epiteliales BSC1 de riñón de mono (*Cercopithecus aethiops*) y MA104 de (*Macaca mulatta*). Se cultivaron en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) con 7% de suero fetal de bovino a una temperatura de 37 °C y 5% de CO₂.

• Producción de la cepa SA11 de RVA.

Se infectaron las células MA104 con la cepa SA11 de RVA (donadas por la Dra. Mary Estes, Baylor College of Medicine, Texas). Las células MA104 se hicieron crecer hasta obtener una monocapa confluente en frascos F162 (de 162 cm²). El virus se activó con tripsina con una concentración final de 10 µg/mL a 37 °C por 30 min, las células fueron lavadas dos veces con 10 mL de MEM sin suero (MEM-ss), se retiró el medio, se añadió el virus previamente activado diluido en MEM-ss y se agregó tripsina extra para obtener una concentración final de 1 µg/mL (medio de infección) para activar a los virus producidos y liberados al medio. Se incubó a 37 °C y 5% de CO₂, hasta observar efecto citopático (redondeamiento de las células y refracción a la luz), alrededor del día 1 al 5 post-infección. Se cosechó el virus congelando los medios con las células infectados a -20 °C, posteriormente se sacaron los frascos con el medio congelado y se agitaron para que la escarcha raspara las paredes provocando la lisis celular. Se tomaron alícuotas del lisado de virus y se almacenaron a -20 °C.

• Titulación de la cepa SA11 de RVA en MA104.

Se obtuvo el título del viral en unidades formadoras de focos por la técnica de inmunoperoxidasa. Para este fin se sembraron 1×10^4 células MA104 por pozo con MEM-7 en placas de 96 pozos y se incubaron por 4 días a 37 °C con una atmósfera húmeda más 5% de CO₂. Se extrajo el medio, se lavaron las células 2 veces con 200 µL/pozo de MEM-ss y se dejaron 150 µL/pozo en el último lavado. El virus se activo previamente con tripsina con una concentración final de 10 µg/mL a 37 °C incubado por 30 min. Se infectaron las células con 50 µl/pozo de diferentes diluciones (1:2x10¹, 1:2x10², 1:2x10³, 1:2x10⁴, 1:2x10⁵, 1:2x10⁷ y 1:2x10⁸) del virus activado y se incubó por 16 hrs. a 37 °C con una atmosfera de CO₂ 5%.

La placa con células se colocó sobre hielo por 15 min y se aspiró el medio dejando aproximadamente 75 µL/pozo. Se lavaron las células con 200 µL/pozo de Buffer fosfato salino (PBS) A o sin Ca ni Mg a 4°C con pH 7.4 y se aspiró la solución hasta dejar aproximadamente 150 µL/pozo. La fijación se realizó con metanol previamente enfriado a -20°C, se colocó 150 µL/pozo y se aspiró el contenido de cada pozo dejando aproximadamente 150 µL/pozo, el procedimiento se realizó por 3 veces y en el último aspirado se dejó 75 µL/pozo. Finalmente se agregó 200 µL/pozo de metanol y se almacenó la placa a -20°C durante 24 hrs.

Se volteo la placa de golpe para retirar todo el metanol y se dejó secar boca abajo por 15 min. Se hicieron dos lavados con PBS A, dejando aproximadamente 75 µL/pozo en el último lavado. Posteriormente se detectaron las células infectadas mediante la incubación con el suero hiperinmune anti-RVA de conejo diluido 1:500 en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO4 1.5 mM, pH 7.4) por 2 hrs a 37 °C. Se lavaron las células dos veces con PBS, dejando en el último

lavado 75 µL/pozo y se colocó la proteína A-Biotinilada diluido en PBS (Sigma P2165-2MG, dilución 1:1000) por 2 hrs a 37°C. Se lavaron las células 3 veces con PBS, dejando en el último lavado 75 µL/pozo y se incubó con estreptavidinaperoxidasa diluido en PBS (Sigma S5512-2MG, dilución 1:1000) por 1 hr a 37°C. Se lavaron las células 3 veces con PBS, dejando en el último lavado 75 µL/pozo y se colocó la solución sustrato (9 mL de buffer de acetatos 0.05M pH 5, 1mL 3-amino 9 etil carbazol, 10 µL de H₂O₂) y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Se lavó la placa 2 veces con agua destilada y se volteo boca abajo para retirar el contenido y se dejó secar. Se realizó el conteo de los focos infecciosos con el objetivo de 20X a lo largo del diámetro del pozo (este procedimiento permite contabilizar aproximadamente 1/5 de la superficie total del pozo) y en base a los primeros 2 pozos donde el conteo sea factible se obtiene el título viral utilizando la fórmula:

UFF/ml= (UFF)(5)(20)(factor de dilución)

• Anticuerpos.

Inmunofluorescencia.

Anti-GM130 producido en ratón (Abcam Cat: ab31561)	1:800
Anti-NSP2 producido en cuyo (producido en laboratorio)	
Anti-IgG de cuyo-Alexa fluor 594 producido en cabra (Invitrogen, Cat: A11076)	1:200
Anti-IgG de cuyo-Alexa fluor 488 producido en cabra (Invitrogen, Cat: A11076)	1:200
Anti-IgG de ratón-Alexa fluor 488 producido en cabra (Invitrogen, Cat: A11076)	1:200
Anti-IgG de ratón-Alexa fluor 594 producido en cabra (Invitrogen, Cat: A11076)	1:200
Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich®, Cat: D9542)	1:1000

 Determinación de la cinética de la distancia al núcleo, tamaño y número de viroplasmas en células BSC1 infectadas con SA11.

Se sembraron $2x10^4$ células BCS1 en 200 µL/pozo de laminillas de 16 pozos y se incubó un día para alcanzar una confluencia de ~90%. La cepa SA11 se activó con tripsina con una concentración final de 10 µg/ml a 37 °C por 30 min, las células fueron lavadas dos veces con MEM-ss, se retiró el medio y se añadieron 50 µL/pozo del virus con una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 previamente activado y diluido en MEM-ss. Se permitió la absorción viral durante 1 hr a 37 °C, se lavaron los pozos dos veces con MEM-ss para retirar el exceso del inóculo y la infección se dejó proseguir a 37 °C por 6, 10, 14 y 18 hrs.

Inmunofluorescencia indirecta.

Las células infectadas se lavaron con 200 µL/pozo de PBS a temperatura ambiente, se retiró el PBS y se agregaron 200 µL/pozo de paraformaldehído al 4% (PFA 4% en PBS pH 7.2) por 15 min a temperatura ambiente y se lavaron las células 3 veces con 200 µL de PBS 1X a 4 °C. Se permeabilizaron las células con 200 µL/pozo de PBT (PBS, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.1 % de triton X100) por 10 min, se retiró la solución y se bloqueó por 1 hr con 200 µL/pozo de PBT-BSA 1% (1% BSA en PBT). El anticuerpo primario anti-NSP2 (1:200) o antiGM130 (1:800) se diluyeron en PBT-BSA 1%, se microcentrifugó durante 2 min a velocidad máxima, se desechó la solución PBT-BSA 1% de los pozos, se colocó 60 µL/pozo de anticuerpo primario y se incubó por 1 hr a temperatura ambiente. Se lavaron las células 3 veces la placa con 200 µL/pozo de PBT-BSA 1%, se diluyó el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón o anti-IgG de cuyo a 1:200) en PBT-BSA 1%, se microcentrifugó durante 2 min

a velocidad máxima, se desechó la solución PBT-BSA 1% de los pozos y se colocó 40 μ L/pozo del anticuerpo secundario y se incubó 1 hr a temperatura ambiente. Se lavaron las células 3 veces con 200 μ L/pozo de PBS 1X, se agregó 50 μ L (1 μ g/mL) de reactivo de DAPI a cada pozo para teñir los núcleos celulares y se dejó por 2 min a temperatura ambiente protegiendo de la luz. Se lavaron las células 3 veces con 200 μ L/pozo PBS, se retiró el PBS para montar la laminilla en medio DAKO Cytomation, se cubrió el portaobjetos con un cubreobjetos de 24x60 mm, se selló con barniz de uñas y se observó en el microscopio de epifluorescencia.

• Transfección del plásmido para sobreexpresar p50.

Para realizar las transfecciones se utilizarán los plásmidos pEGFP-C1 y pEGFPp50 (donados por el Dr. William Britt). La construcción del plásmido pEGFP-p50 va dar como producto la proteína de interés que llevara en su extremo carboxilo la fusión de GFP facilitando la localización de las células transfectadas

Se sembraron en laminillas de 16 pozos 2x10⁴ células BCS1 por pozo con 200 µL MEM-7 y sin antibiótico, un día antes de la transfección, alcanzando una confluencia de ~90% y las células se lavaron 2 veces con 200 µL/pozo Opti-MEM dejando 100 µl. Se tomaron 100 ng de plásmido y se diluyeron en 25 µl de Opti-MEM, en otro tubo se colocó 1 µl de lipofectamina y se diluyó en 25 µl de Opti-MEM, se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se mezcló lipofectamina con los plásmidos diluidos por separado y se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Esta mezcla se agregó a las células previamente lavadas y se incubaron 37 °C por 4 hrs. Se retiró el medio de transfección, se colocó Opti-MEM-7 y sin antibiótico, se dejó

incubando por 24 hrs a 37 °C. Las células se infectaron con RVA SA11 previamente activado con tripsina 10 μ g/ml a 37 °C por 30 min con una de MOI 0.1, para este fin las células fueron lavadas dos veces con MEM-ss, se retiró el medio, se añadió 50 μ l/pozo del virus diluido en MEM-ss y se incubó durante 1 hr a 37 °C. Después las células se lavaron dos veces con MEM-ss y la infección se dejó proseguir a 37 °C por 10 y 18 hpi. Las células fueron procesadas para inmunofluorescencia como se describió anteriormente para el análisis de los viroplasmas.

• Tratamiento con Ciliobrevina D.

Se realizaron otros ensayos para estudiar la dinámica de los viroplasmas en células infectadas donde se utilizó un inhibidor de ATPasa de Dineina. Se sembraron en laminillas de 16 pozos 2x10⁴ células BCS1 por pozo con 200 µL MEM-7, alcanzando una confluencia de ~90% y se infectaron con RVA SA11 con una MOI de 0.1. Para este fin el virus se activó con tripsina con una concentración final de 10 µg/ml a 37 °C por 30 min, las células fueron lavadas dos veces con MEM-ss, se retiró el medio, se añadió 50 µL/pozo el virus diluido en MEM-ss y se incubó durante 1 hr a 37 °C. Después se lavaron dos veces con 200 µL/pozo MEM-ss y la infección se dejó proseguir a 37 °C. A las 2 hpi se remplazó el medio con 200 µL/pozo de MEM-ss conteniendo 50µM de Ciliobrevina D (Stock 5.mM diluido en DMSO) o con DMSO control y la infección se dejó proseguir a 37 °C por 10 y 18 hpi. Las células fueron procesadas para inmunofluorescencia como se describió anteriormente.

• Procesamiento de imágenes.

Las muestras se observaron por microscopia de epifluorescencia (Microscopio Olimpus IX70). Las imágenes fueron tomadas y analizadas con el software IMAGE PRO PLUS 6.2 (Media Cybernetics). Todas las imágenes fueron tomadas con el objetivo de 60X

• Gráficos y estadísticos.

Los datos fueron analizados en el programa Microsoft Office Excel 2007 y/o Origin 8. Para determinar la significancia estadística se llevó a cabo un Análisis de Varianza con prueba de Post Hoc de Tukey con una significancia de p<0.05, utilizando el software Statistical Analysis (SAS).

Resultados.

Cinética de distancia al núcleo, número y tamaño de viroplasmas de RVA SA11 a 6, 10, 14 y 18 hpi

En un estudio previo (Eichwald, et al, 2004) se había descrito que la progresión del número y tamaño de los viroplasmas en células MA104 infectadas con SA11 tiene un efecto en el aumento de tamaño y disminución del número de viroplasmas conforme pasa el tiempo de infección. También se describió una que durante la infección con SA11 hay una migración de los viroplasmas hacia la región perinuclear de la célula infectada (Eichwald, *et al.*, 2012). Nosotros ampliamos estos estudios determinando la cinética de distancia al núcleo, número y tamaño de viroplasmas de RVA en otra línea celular, células BSC1 infectada con la misma cepa viral SA11. A diferencia de los trabajos previos nosotros medimos directamente la distancia al núcleo de cada viroplasma en lugar de determinar un valor promedio en base al área que ocupa los viroplasmas por epifluorescencia (Eichwald, *et al.*, 2012).

Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes de inmunofluorescencia de células BSC1 infectadas con RVA SA11 a una MOI de 0.1, se visualizaron los viroplasmas con suero hiperinmune anti-NSP2, la proteína mayoritaria de los viroplasmas contabilizándose un total de 9310 viroplasmas en tres experimentos independientes. Se observó que los viroplasmas reducen su distancia promedio de 8.01 μ m a las 6 hpi a solamente 2.43 μ m a las 18 hpi, midiendo la distancia a partir de la periferia del viroplasma a la periferia del núcleo celular (Fig. 23 y Fig. 24). Por otro lado, el área aumenta de 0.61 μ m² a 4.16 μ m² en promedio de las 6 a las 18 hpi, mientras que el número de viroplasmas disminuye de 38.5 a 9.3 viroplasmas

promedio/célula en este intervalo de tiempo (Fig. 23 y fig. 24). Cuando se analizó la información obtenida desde el punto de vista de frecuencia acumulada de los viroplasmas encontramos que la probabilidad de hallar a los viroplasmas en un rango de 0-5 µm del núcleo es de aproximadamente un 45% entre las 6 y las 10 hpi., mientras que a las 14 hpi sube a 65% y a las 18 hpi sube a 85%. Esto nos indica que existe un desplazamiento de un gran número de viroplasmas hacia la región perinuclear (Fig. 25a). Con respecto al área de los viroplasmas, se puede apreciar un incremento conforme pasa el tiempo de la infección. La probabilidad de encontrar a los viroplasmas en un rango de tamaño de 0-2.5 m μ^2 es mayor del 90% a las 6 y 10 hpi, a las 14 hpi baja a 75% y las 18 hpi a 50% (Fig. 25b). El número de viroplasmas también se modifica en el curso de la infección, observando claramente una tendencia en la disminución en el número de estas estructuras virales por célula. Desde los dos primeros tiempos que se utilizaron para la cinética, 6 y 10 hpi, se puede apreciar una tendencia hacia la disminución de estas estructuras virales. La probabilidad de encontrar una célula infectada con menos de 40 viroplasmas es de un 55% a las 6 hpi y de un 70% a las 10 hpi, con respecto a los tiempos de 14 y 18 hpi la mayoría de las células infectadas contabilizadas presentaron un número menor de 40 viroplasmas por célula (Fig. 25c).



18 hpi

14 hpi

10 hpi

6 hpi



Figura 23. Determinación de la cinética de la distancia al núcleo, número y tamaño de viroplasmas de las 6-18 hpi con intervalos de 4 hrs en células BSC1 infectadas con SA11. Se utilizó un anticuerpo anti-NSP2 para detectar los viroplasmas (rojo) y el núcleo con DAPI (azul). La barra indica 20 micras de longitud con objetivo de 60X.



Figura 24. Relación entre la distancia al núcleo con el área y número de viroplasmas en células BSC1 infectadas con SA11. A) Distancia promedio a la región perinuclear y área promedio en diferentes tiempos post-infección. B) Distancia promedio a la región perinuclear y número de viroplasmas por célula en diferentes tiempos post-infección. A partir de 3 experimentos independientes. Promedio de 90 células (30 células por ensayo). Cada valor es expresado como el promedio ± error estándar. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0.05). Letras en mayúsculas (negras) corresponde a la distancia promedio a la región perinuclear (A y B) y las letras en minúsculas (gris) corresponde al área promedio (A) o al número de viroplasmas por célula (B).



Figura 25a. Frecuencia acumulada de la distancia al núcleo de los viroplasmas de células BSC1 infectadas con SA11 a diferentes tiempos post-infección a partir de datos de 3 experimentos independientes.



Figura 25b. Frecuencia acumulada del área de los viroplasmas de células BSC1 infectadas con SA11 a diferentes tiempos post- infección a partir de datos de 3 experimentos independientes.



Figura 25c. Frecuencia acumulada de número de viroplasmas/célula en células BSC1 infectadas con SA11 a diferentes tiempos post- infección a partir de datos de 3 experimentos independientes.

Para verificar la reproducibilidad de los ensayos se graficó el número de viroplasmas por célula de cada experimento, se observó una elevada dispersión en el número de viroplasmas entre 6-10 hpi y menor dispersión entre 14-18 hpi con una alta reproducibilidad en las tres repeticiones (Fig. 26).

Estos hallazgos sugieren que los viroplasmas se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo y ancho del citoplasma y luego migran hacia la región perinuclear. Nuestros resultados de la dinámica de los viroplasmas de RVA SA11 en células BSC1 infectadas son consistentes con estudios previos, presentan una misma dinámica que los observados con la misma cepa viral infectando a la línea celular MA104, en donde los viroplasmas tienden a disminuir su distancia al núcleo y número con un aumento en su área (Cabral-Romero y Padilla-Noriega, 2006; Eichwald, *et al.*, 2004 y 2012).



Figura 26. Número de viroplasmas por célula en células BSC1 infectadas con SA11 a distintos tiempos post-infección. Se observa una elevada reproducibilidad en los tres experimentos independientes.

Efecto de la sobre-expresión de p50 en el número, tamaño y distribución de los viroplasmas hacia el núcleo de células infectadas con RVA SA11 a 10 y 18 hpi.

Las proteínas motoras tienen una importante función en el tráfico celular, incluso hay reportes que indican que los componentes virales utilizan estas proteínas para llevar a cabo su desplazamiento al interior de la célula. El CMD y su cofactor el CD, son generalmente necesarios para transportar diferentes cargas hacia la región perinuclear. En base a esta información pensamos que el CMD podría estar involucrado en la migración y crecimiento de los viroplasmas de RVA. Para determinar si el CMD está involucrado en la migración y crecimiento de los viroplasmas se decidió inhibir la función de este complejo mediante la sobreexpresión de la subunidad p50 del CD y el uso de ciliobrevina D (droga que inhibe la ATPasa del CMD) por separado (Firestone *et al.*, 2012).

Con el fin de sobreexpresar p50 las células BSC1 fueron transfectadas de manera transitoria con un plásmido que permite la expresión de p50 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP). Además se realizó la transfección de las células con un

plásmido control que permite la expresión de GFP (pEGFP). En estudios previos se demostró que en esta construcción la presencia de GFP como gene reportero no afecta la función de p50 (Burkhardt *et al.*, 1997)

Las células BSC1 fueron transfectadas con pEGFP o pEGFP-p50, después de 24 hrs fueron infectadas con RVA SA11 con una MOI de 0.1. A 10 y 18 hpi, las células fueron tratadas y procesadas para detectar el desplazamiento de los viroplasmas mediante inmunofluorescencia. Las imágenes representativas de las tres condiciones son mostradas en la figura 27. En células con pEGFP-p50 se observó un fenotipo claramente diferente a las 18 hpi que las células con pEGFP, con viroplasmas de menor tamaño y más alejadas del núcleo.



Figura 27. La sobreexpresión de p50 interrumpe la acumulación de los viroplasmas en la región perinuclear. Células BSC1 fueron transfectadas con pEGFP o pEGFP-p50, a las 24 hrs post-transfección se infectaron con RVA SA11 y se fijaron a 10 hpi (A, C y E) o a las 18 hpi (B, D y F). (A-B) Células sin transfectad, (C-D) células transfectadas con pEGFP y (E-F) células transfectadas con pEGFP-p50. Los viroplasmas fueron detectados con anti-NSP2 (rojo), EGFP y EGFP-p50 fueron detectadas por su fluorescencia intrínseca (verde), el núcleo con DAPI (Azul).). La barra indica 20 micras de longitud con objetivo de 60X.

Cuantificación de la distancia de los viroplasmas hacia la región perinuclear a 10 y 18 hpi en células BSC1 infectadas con RVA SA11 y transfectadas con pEGFP-p50 ó pEGFP

Para determinar el efecto de la sobre-expresión de p50 fusionada a GFP en la migración al núcleo de viroplasmas en células BSC1 infectadas con SA11 a una MOI de 0.1 se realizaron 4 experimentos independientes contabilizándose un total de 4871 viroplasmas (Fig. 27). Se observó una disminución en la distancia promedio de los viroplasmas hacia la región perinuclear de 10.07 µm en promedio a las 10 hpi a solamente 4.06 µm en promedio a las 18 hpi en células transfectadas con pEGFP, mientras que en las células transfectadas con pEGFP-p50 la disminución de la distancia fue mínima de 10.88 µm en promedio a las 10 hpi a solamente 9.89 µm en promedio a las 18 hpi (Fig. 28). Estos datos demuestran que la sobreexpresión de EGFP-p50 afecta la migración al núcleo de viroplasmas en células BSC1 infectadas con SA11.

Se compararon los resultados de las células transfectadas mediante frecuencias acumuladas. En células que expresan EGFP la probabilidad de encontrar los viroplasmas en un rango de distancia de 0-5 μ m a las 10 hpi es de 35% y a las 18 hpi es de un 70%, mientras que en células que expresan EGFP-p50 la probabilidad de encontrar a los viroplasmas entre 0-5 μ m es de 40% a las 10 hpi y de 45% a las 18 hpi (Fig. 29).







Figura 29. Frecuencia acumulada en distancia al núcleo de los viroplasmas a diferentes tiempos de infección en células infectadas con SA11 y co-transfectadas para expresar EGFP-p50 o EGFP a partir de datos de 4 experimentos independientes.

Cuantificación de área y número de viroplasmas a 10 y 18 hpi en células BSC1 infectadas con RVA SA11 y transfectadas con pEGFP-p50 ó pEGFP.

En las células BSC1 transfectadas con pEGFP o pEGFP-p50 y co-infectadas con RVA SA11 mostradas en las figuras 30 y 31 también se analizó el área de los viroplasmas en μ m². En las condiciones control expresando solo EGFP el área de los viroplasmas aumentó de 0.72 μ m² en promedio a las 10 hpi a 2.96 μ m² en promedio a las 18 hpi. En la condición experimental de expresión de EGFP-p50 el área promedio presentó un mínimo incremento de 0.68 μ m² a 1.11 μ m² a las 10 y 18 hpi, respectivamente (Fig.30).



Figura 30. Área promedio de los viroplasmas a las 10 y 18 hpi en células BSC1 infectadas con SA11 coexpresando EGFP o EGFP-p50 a partir de 4 experimentos independientes. Promedio de 40 células (10 células por ensayo) con pEGFP o pEGFP-p50. Cada valor es expresado como el promedio \pm error estándar. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0.05).

En el análisis de frecuencia acumulada del área de los viroplasmas de células BSC1 infectadas con RVA SA11 se observó que en las células que expresan EGFP la

probabilidad de encontrar los viroplasmas en un rango de área de 0-2.5 μ m² a las 10 hpi es mayor al 95% y a las 18 hpi es de un 60%, mientras que en células que expresan EGFP-p50 la probabilidad de encontrar viroplasmas de 0-2.5 μ m² es mayor al 95% a las 10 hpi y apenas cambia a 90% a las 18 hpi. (Fig. 31).



Figura 31. Frecuencia acumulada en área de los viroplasmas a los diferentes tiempos de infección en células infectadas con SA11 y co-transfectadas para expresar EGFP-p50 o EGFP a partir de datos de 4 experimentos independientes.

También se analizó el número de viroplasmas promedio/célula en células BSC1 infectadas con RVA SA11. Al expresar EGFP hubo una disminución de 41.1 a 12.2 viroplasmas promedio/célula entre las 10 y 18 hpi. En contraste, al expresar EGFP-p50, el número de viroplasmas disminuyó mínimamente de 37.4 a 31.6 viroplasmas promedio/célula entre las 10 y 18 hpi (Fig. 32).



Figura 32. Número de viroplasmas promedio/célula a las 10 y 18 hpi en células BSC1 infectadas con SA11 coexpresando EGFP o EGFP-p50 a partir de 4 experimentos independientes. Promedio de 40 células (10 células por ensayo) con pEGFP o pEGFP-p50. Cada valor es expresado como el promedio \pm error estándar. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0.05).

Mediante análisis de frecuencia acumulada del número de viroplasmas por célula en células BSC1 infectadas con RVA SA11 se observa claramente que sobreexpresión de p50 retarda la disminución de viroplasmas conforme pasa el tiempo de la infección. La probabilidad de encontrar una célula infectada con menos de 40 viroplasmas expresando EGFP a las 10 hpi es de un 50% y a las 18 hpi el 100% de las células contabilizadas presentan menos de 40 viroplasmas por célula, mientras que las células que expresan EGFP-p50 a las 10 hpi es de un 65% y de un 80% a las 18 hpi (Fig. 33). Con esta forma de analizar los resultados se aprecia que aunque el efecto de la sobreexpresión de p50 en células infectadas tiene un efecto en la disminución de los viroplasmas, el proceso no es detenido por completo.



Figura 33. Frecuencia acumulada en el número de los viroplasmas/célula a los diferentes tiempos de infección en células infectadas con SA11 y co-transfectadas para expresar EGFP-p50 o EGFP a partir de datos de 4 experimentos independientes

Para verificar la reproducibilidad de los ensayos se graficó el número de viroplasmas por célula de cada experimento. En forma similar a lo que se observó en la figura 27 en células BSC1 infectadas con SA11 al expresar EGFP el número de viroplasmas muestra una gran dispersión a las 10 hpi y mucha menor dispersión a las 18 hpi. En contraste, en células que expresan EGFP-p50 se observa alta dispersión tanto a las 10 como a las 18 hpi en el número de viroplasmas. Es notable que a pesar de la variabilidad intrínseca del número de viroplasmas por célula, la reproducibilidad de los cuatro experimentos independientes es alta (Fig. 34).



En conjunto, estos resultados nos indican que la inhibición del CMD (mediante la sobreexpresión de p50) tiene un efecto en la migración al núcleo, el incremento en su área y el número de viroplasmas por célula.

Efecto de la inhibición de CMD en la formación de viroplasmas en células BSC1 infectadas con RVA SA11 a 10 y 18 hpi.

Ciliobrevina D fue descrita recientemente como una molécula antagónica del CMD, actúa como un bloqueador específico y reversible de la AAA+ATPasa (Firestone *et al.*, 2012). Por este motivo, se utilizó este compuesto para estudiar su efecto sobre la dinámica de los viroplasmas.

Para determinar el efecto de Ciliobrevina D, células BSC1 fueron infectadas con SA11 a una MOI de 0.1. A las 2 hpi se colocó Ciliobrevina D a 50 μM o DMSO y se dejó incubando la infección hasta las 10 y 18 hpi. Las células fueron procesadas por inmunofluorescencia y se determinó la distancia al núcleo, número y tamaño de los viroplasmas. En células control y tratadas con DMSO se observó un fenotipo similar, a las 10 hpi, los viroplasmas eran pequeños, numerosos y alejadas de la zona perinuclear, pero a las 18 hpi estas estructuras virales tienen un tamaño mayor, el número se redujo y se encuentran más cerca de a zona perinuclear. Las células tratadas con Ciliobrevina D fue claramente discernible un fenotipo diferente, a las 18 hpi en comparación con las células control o con DMSO, ya que los viroplasmas presentan menor tamaño, son numerosos y tienen una mayor distancia al núcleo (Fig. 35).



Figura 35. Determinación del efecto de Ciliobrevina D sobre la cinética de la distancia al núcleo, número y tamaño de los viroplasmas en células BSC1 infectadas con SA11. Células BSC1 infectadas con SA11 y fijadas a las 10 hpi (A, C y E) ó a las 18 hpi (B, D y F). (A-B) células no tratadas con diluyente ni droga, (C-D) células tratadas con DMSO y (E-F) células tratadas con Ciliobrevina D (E-F). Los viroplasmas fueron detectados con anti-NSP2 (verde) y el núcleo con DAPI (Azul). Amplificación con el objetivo 60X.
Cuantificación de la distancia de los viroplasmas hacia la región perinuclear a 10 y 18 hpi en células BSC1 infectadas con RVA SA11 y tratadas con Ciliobrevina D.

Para determinar el efecto de Ciliobrevina D sobre la migración al núcleo de los viroplasmas en células BSC1 infectadas con SA11 con una MOI de 0.1 se contabilizaron 18,086 viroplasmas. La distancia promedio de los viroplasmas hacia la región perinuclear en células control tratadas con DMSO fue de 9.2 μ m a las 10 hpi y se redujo a 4.54 μ m a las 18 hpi, mientras que en las células tratadas con Ciliobrevina D la disminución de la distancia apenas fue detectable al pasar de 9.65 μ m a las 10 hpi a 8.83 μ m a las 18 hpi (Fig. 36).



Figura 36. Distancia promedio de los viroplasmas a las 10 y 18 hpi en células BSC1 infectadas con SA11 y tratadas o no con Ciliobrevina D a partir de 3 experimentos independientes. Promedio de 90 células (30 células por ensayo) con DMSO o Ciliobrevina D. Cada valor es expresado como el promedio \pm error estándar. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0.05).

Igual que en el ensayo de sobreexpresión p50, los resultados fueron analizados mediante frecuencias acumuladas. En las células tratadas con DMSO la probabilidad de encontrar los viroplasmas en un rango de distancia de 0-5 μ m a las 10 hpi es de 40% y a las 18 hpi es de un 65%, mientras que en células con Ciliobrevina D la probabilidad de encontrar a los viroplasmas entre 0-5 μ m es de 40% a las 10 hpi y de 45% a las 18 hpi (Fig. 37).



Figura 37. Frecuencia acumulada en distancia al núcleo de los viroplasmas para los diferentes tiempos de infección en células BSC1 infectadas con SA11 y tratadas o no con Ciliobrevina D a partir de 3 experimentos independientes.

Cuantificación de área y número de viroplasmas a las 10 y 18 hpi en células BSC1 infectadas con SA11 y tratadas con Ciliobrevina D.

En las células BSC1 infectadas con RVA SA11 y tratadas o no con Ciliobrevina D también se determinó el área de los viroplasmas. El área de viroplasmas en células control tratadas con DMSO aumenta de 1.62 μ m² a 6.45 μ m² de las 10 a 18 hpi. En

contraste, en células tratadas con Ciliobrevina D el área promedio presentó un aumento mínimo de 0.71 μ m² a 1.22 μ m² de las 10 a las 18 hpi (Fig.38).



Figura 38. Área promedio de los viroplasmas a las 10 y 18 hpi en células BSC1 infectadas con SA11 y tratadas o no con Ciliobrevina D a partir de 3 experimentos independientes. Promedio de 90 células (30 células por ensayo) con DMSO o Ciliobrevina D. Cada valor es expresado como el promedio \pm error estándar. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0.05).

En el análisis de frecuencia acumulada en células tratadas con DMSO la probabilidad de encontrar los viroplasmas en un rango de área de 0-2.5 μ m² a las 10 hpi es de 80% y a las 18 hpi se reduce a 40%, mientras que en células con ciliobrevina D la probabilidad de encontrar viroplasmas de 0-2.5 μ m² es de 90% a las 10 hpi y apenas cambia a 85% a las 18 hpi, i.e. su área no se incrementa sustancialmente (Fig. 39).



Figura 39. Frecuencia acumulada en área de los viroplasmas para los diferentes tiempos de infección en células BSC1 infectadas con SA11 y tratadas o no con Ciliobrevina D a partir de 3 experimentos independientes.

En relación al número viroplasmas, en células control tratadas con DMSO se observó una disminución de los viroplasmas promedio/célula de 47.76 a 18.21 de 10 a las 18 hpi respectivamente, mientras que en células tratadas con Ciliobrevina D el número de viroplasmas no disminuyó considerablemente al pasar de 71.34 a 62.84 de 10 a 18 hpi (Fig. 40).



Figura 40. Número de viroplasmas promedio/célula a las 10 y 18 hpi en células BSC1 infectadas con SA11 y tratadas o no con Ciliobrevina D a partir de 3 experimentos independientes. Promedio de 90 células (30 células por ensayo) con DMSO o Ciliobrevina D. Cada valor es expresado como el promedio \pm error estándar. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0.05).

En el análisis de frecuencia acumulada podemos observar que la droga Ciliobrevina D tiene un mayor efecto en retardar la disminución de viroplasmas por célula que la sobreexpresión de p50 (Fig. 33 y 41). En las células tratadas con DMSO la probabilidad de encontrar una célula infectada con menos de 40 viroplasmas a las 10 hpi es de un 60% y a las 18 hpi aproximadamente el 100% de las células contabilizadas presentan menos de 40 viroplasmas por célula, mientras que las células tratadas con Ciliobrevina D a las 10 hpi escasamente un 10% de las células tenían menos de 40 viroplasmas y un 25% tenían esta característica a las 18 hpi (Fig. 41). A pesar que la droga Ciliobrevina D tiene un mayor efecto en el retraso de la disminución numérica de viroplasmas por célula, no detuvo por completo este proceso.



Figura 41. Frecuencia acumulada de número de viroplasmas por célula para los diferentes tiempos de infección en células BSC1 infectadas con SA11 y tratadas o no con Ciliobrevina D a partir de 3 experimentos independientes.

Para verificar la reproducibilidad de los ensayos se graficó el número de viroplasmas por célula de cada experimento. En forma similar a lo que se observó en las figuras 28 y 36, en células BSC1 infectadas con SA11 y tratadas con DMSO el número de viroplasmas muestra una gran dispersión a las 10 hpi y menor dispersión a las 18 hpi. En contraste, en células tratadas con ciliobrevina D se observa alta dispersión tanto a las 10 como a las 18 hpi. A pesar de la variabilidad característica del número de viroplasmas, la reproducibilidad de los tres experimentos independientes es alta (Fig. 42).



Figura 42. Número de viroplasmas por célula infectadas con SA11 y tratadas o no con Ciliobrevina D. Se observa una elevada reproducibilidad en los experimentos independientes.

Al igual que la sobreexpresión de p50, el compuesto Ciliobrevina D tiene un efecto en el desplazamiento de los viroplasmas, así como en el aumento de su área y en la disminución del número de viroplasmas por célula.

Discusión.

Cuando los virus infectan a la célula, los subsecuentes pasos en su ciclo replicativo involucran la interacción entre diferentes componentes celulares como virales. Entre estas interacciones se encuentra la formación de estructuras denominadas cuerpos de inclusión, fábricas virales, agresomas y viroplasmas. Estas estructuras que en algunos casos se ubican en la región perinuclear sirven para que el virus se replique, ensamble o ambas funciones. Entre los virus que inducen la formación de estas complejas estructuras se encuentran los pertenecientes a las familias de Poxviridae, Iridoviridae, Asfarviridae, Herpesviridae, Togaviridae, Bunyaviridae, Flaviviridae, Reoviridae y potencialmente también por Coronaviridae, Arteriviridae y Polioviridae (Novoa et al., 2005). El desplazamiento hacia la región perinuclear de algunas de estas estructuras virales es facilitado por las proteínas motoras asociadas a los MTs, especialmente por el CMD. Por ejemplo, las células infectadas con el virus de la fiebre porcina tienden a formar cuerpos de inclusión que se ubican en la región perinuclear, pero cuando estas células son tratadas con 2-metoxi-(2,3,4-trimetoxifenil)2,4,6-cicloheptano-1-uno (un compuesto análogo de colchicina que provoca la despolimerización de los MTs) antes de la infección, los cuerpos de inclusión no migran y se encuentran distribuidos en el citoplasma. Al retirar la droga, estas estructuras virales se desplazan hacia la periferia nuclear y presentan un aumento de tamaño. Estos resultados indican que la red de MTs está involucrada en el transporte y posible fusión de los cuerpos de inclusión de ASFV (de Matos y Carvalho, 1993; Blondel et al., 2009). También en células infectadas por Hantavirus se forman cuerpos de inclusión que tienden a acumularse en la región perinuclear

y el tratamiento con nocodazol o la sobreexpresión de p50 provoca una redistribución en el citoplasma de estas estructuras virales. El efecto de nocodazol sugiere que los MTs facilitan el transporte de estos cuerpos de inclusión formados por la proteína viral N, mientras que la inhibición de su transporte a la región perinuclear causado por la sobreexpresión de p50 indica que este transporte podría estar mediado por el CMD (Ramanathan, et al., 2007). La descripción reciente de Ciliobrevina D como un compuesto que inhibe específicamente la ATPasa del CMD (Firestone *et al.*, 2012), ha permitido observar que los compartimientos de ensamble viral de citomegalovirus producidos en la región perinuclear en fibroblastos de humano, son en parte dependientes del CMD para su organización estructural, ya que al inhibir la función del CMD con Ciliobrevina A, las estructuras virales se encuentran menos compactas (Clippinger y Alwine, 2012). Un caso similar ocurre con los agresomas formados por la co-expresión de las proteínas virales E1*E4 de papilomavirus humano tipo 18, que al tratar las células transfectadas con Ciliobrevina D se afecta la formación de estas estructuras (Kajitani et al., 2013). La proteína µ2 de algunas cepas de Reovirus, miembro de la familia *Reoviridae*, es

una proteína viral asociada a los MTs, y se sabe que esta red celular tiene un papel importante en la formación y organización de los cuerpos de inclusión de reovirus (Parker *et al.*, 2002). El virus que estudiamos en este trabajo, RVA, pertenece a la misma familia que los reovirus, *Reoviridae*. En los RVA los cuerpos de inclusión se denominan viroplasmas, las cuales necesitan de una red de MTs para aumentar su área y disminuir su número en la línea celular MA104 infectadas con la cepa SA11 o RF de RVA (Cabral-Romero y Noriega-Padilla, 2006; Eichwald, *et al.*, 2004). Usando la misma línea celular MA104 se describió que existe un desplazamiento hacia la región perinuclear de los viroplasmas de RVA que depende de una red de MTs que son estabilizados con la asociación de tubulina acetilada y la formación de paquetes de MTs alrededor de los viroplasmas (Eichwald, et al., 2012). Nosotros describimos en este trabajo la cinética del desplazamiento intracelular, tamaño y número de viroplasmas que se lleva a cabo en la línea celular BSC1 infectadas con el RVA SA11. En forma similar a lo reportado en la línea celular MA104, observamos que los viroplasmas en células BSC1 infectadas con el RVA SA11 tienden a disminuir su distancia hacia la región perinuclear durante el tiempo de infección, mientras que el área de estas estructuras aumenta y su número disminuye. Interesantemente, estudios previos señalan la participación de Eg5, un motor de kinesina de la familia kinesina-5, en el desplazamiento de los viroplasmas, en base a experimentos de la inhibición de Eg5 con monastrol en células MA104 infectadas con RVA SA11. Sin embargo, los autores no descartan que otras proteínas motoras como el CMD también participe en este proceso (Eichwald, et al., 2012). Por lo cual, en este trabajo se estudió el papel que tiene el CMD en la dinámica de los viroplasmas. Utilizando dos metodologías que afectan la función del CMD se observó que a las 10 hpi los viroplasmas en células que expresan EGFP-p50 o en presencia de Ciliobrevina D la migración intracelular de estas estructuras virales se comporta casi igual que las células control que expresan EGFP o que fueron tratadas con el diluyente de la droga DMSO. A las 18 hpi existe un desplazamiento considerable de los viroplasmas en los controles, mientras que las células que expresan EGFP-p50 o fueron tratadas con Ciliobrevina D este desplazamiento es mínimo. Posiblemente este desplazamiento mínimo se deba a dos factores: el uso de otras proteínas motoras para realizar este desplazamiento y/o que la función del

CMD no se inhibe completamente. En cualquier caso, nuestro estudio demuestra que el CMD es necesario para que se lleve a cabo la migración intracelular de los viroplasmas. Aunque nuestro estudio no es directamente comparable con el de Eichwald, *et al.* (2012) en el que utilizaron un inhibidor de Eg5 y emplearon una metodología distinta a la medición directa de la distancia al núcleo de los viroplasmas, estimando solo el área en la que preferentemente se ubican los viroplasmas, la comparación en base a las imágenes obtenidas en ambos estudios indica que nuestro estudio la magnitud de la inhibición de la migración de los viroplasmas fue mucho mayor, sugiriendo que el motor fundamental de los viroplasmas es el CMD.

En relación a la comparación entre las dos metodologías que usamos para inhibir la función del CMD, sobreexpresión de p50 o tratamiento con Ciliobrevina D, la magnitud con la que se interrumpe parcialmente el movimiento de los viroplasmas al núcleo, tamaño y el número se afectaron con ambas metodologías pero la magnitud del efecto inhibitorio varía cuando se comparan los dos tratamientos. Posiblemente esta diferencia se deba a las diferencias metodológicas en la eficiencia de inhibición del CMD que se obtiene con las dos metodologías.

Por otro lado, el número de viroplasmas disminuye considerablemente en los controles en los diferentes tiempos de infección, mientras que las células que expresan EGFP-p50 o que fueron tratadas con Ciliobrevina D el número de viroplasmas disminuye poco, además las células con Ciliobrevina D presentaron un mayor número de viroplasmas a las 10 y 18 hpi que en ausencia de tratamiento. Posiblemente esto se deba a que la droga es altamente eficiente para inhibir el CMD, por lo que estos resultados sugieren que los viroplasmas presentan una

fusión desde tiempos tempranos de la infección, previamente a que estas se puedan ver por inmunofluorescencia, lo que en nuestra experiencia es aproximadamente a las 2-3 hpi.

Desconocemos como la interrupción de la dinámica de los viroplasmas podría afectar el ciclo replicativo de RVA, una hipótesis es que la migración de estas estructuras virales hacia la región perinuclear favorece la interacción con el RE, lo que es necesario para que las DLPs gemen al RE y adquieran la capa proteíca externa necesaria para la infectividad viral. Sin embargo, se ha reportado que la interrupción de la migración de los viroplasmas por la despolimerización de los MTs con nocodazol en células MA104 infectadas con RVA SA11 y en células CV1 infectadas con RVA RF no afecta la producción viral (Eichwald, et al. 2012), aunque esto podría deberse a la alta multiplicidad de infección (MOI) que utilizan en cada ensayo, MOI de 25 y 5 respectivamente, lo cual podría alterar el sistema llevándola a una saturación, por lo cual no es posible observar algún cambio. Por otro lado, la gran cantidad de viroplasmas que se producen durante el proceso de infección podría ser suficiente para la replicación eficiente de partículas virales sin importar su migración o fusión. Se ha sugerido que en las fábricas virales pueden acumularse grandes cantidades de proteínas virales que son producidas en exceso durante la infección (Novoa et al., 2005). En el caso de RVA se ha descrito que existe un exceso en la producción de proteínas virales, mayor de la necesaria para la replicación viral (Ayala-Breton, 2009). Por otro lado, el modelo donde se ha llevado la mayor parte de los estudios del ciclo replicativo de RVA es en células MA104 (células epiteliales de riñón de mono) que es una línea celular muy diferente a las células blanco diferenciadas (enterocitos) durante una infección natural. La línea

celular donde se han realizado estudios del ciclo replicativo de RVA que son más parecidas a los enterocitos es la línea celular CaCo2. Se ha descubierto que existen diferencias durante el ciclo replicativo, por ejemplo: la salida de la progenie viral en células MA104 se produce por lisis celular y en células CaCo2 no produce lisis y su salida se realiza por la parte apical de la célula y para que esto ocurra es necesario un transporte vesicular no clásico del RE a la cara apical de la célula (Jourdan *et al.*, 1997). Debido a las diferencias entre las líneas celulares y en el ciclo replicativo no podemos extrapolar si la inhibición de la migración de los viroplasmas tenga el mismo efecto en la línea celular CaCo2 o en las células blanco.

En resumen, los resultados obtenidos nos indican que el CMD es necesario para el desplazamiento hacia la región perinuclear de los viroplasmas de RVA. Así como para el aumento de tamaño y disminución en número de los viroplasmas. Estos resultados no excluyen la participación de otros motores celulares en el movimiento de los viroplasmas.

Finalmente, desconocemos a qué nivel de la replicación viral pueda afectar la interrupción de la dinámica de estas estructuras virales.

Conclusiones.

- En células BSC1 infectadas con RVA SA11 los viroplasmas tienden a disminuir su distancia al núcleo, así como el número de viroplasmas por célula. Con respecto al tamaño, estos van aumentando conforme va pasando el tiempo de infección.
- Los resultados obtenidos mediante la inhibición del CMD con dos metodologías diferentes nos indica que el desplazamiento hacia la región perinuclear es mediada por el CMD al menos en parte, sin excluir la participación de otras proteínas motoras. El aumento de tamaño y la disminución de los viroplasmas es otro proceso en donde participa el CMD.
- Nuestros resultados sugieren que la formación de los viroplasmas es independiente de la función del CMD, y que en presencia del inhibidor del CMD siguen apareciendo viroplasmas pequeños.

Perspectivas.

- Evaluar el efecto que tiene la interrupción de la dinámica de los viroplasmas en el rendimiento de RVA cuantificando mediante unidades infectivas formadoras de focos y RNA viral de doble cadena.
- Estudiar el efecto que tiene la interrupción de la dinámica de los viroplasmas en la producción de DLPs/TLPs mediante gradientes.
- Determinar el efecto que tiene la interrupción de la dinámica en la expresión de proteínas virales.

Referencias.

- Afrikanova, I., Miozzo, M. C., Giambiagi, S., y Burrone, O. (1996). Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. The Journal of general virology, 77 (Pt 9), 2059–2065. https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-9-2059
- Ahmad, F. J., He, Y., Myers, K. A., Hasaka, T. P., Francis, F., Black, M. M., y Baas, P. W. (2006). Effects of dynactin disruption and dynein depletion on axonal microtubules. Traffic (Copenhagen, Denmark), 7(5), 524–537. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00403.x
- Alberts B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter. (2002). Biología Molecular de la Célula (pp. 908-982).
 4 ed., España: Edición Omega.
- Allan V. J. (2011). Cytoplasmic dynein. Biochemical Society transactions, 39(5), 1169–1178. https://doi.org/10.1042/BST0391169
- Alonso, C., Miskin, J., Hernáez, B., Fernandez-Zapatero, P., Soto, L., Cantó, C., Rodríguez-Crespo, I., Dixon, L., y Escribano, J. M. (2001). African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. Journal of virology, 75(20), 9819–9827. https://doi.org/10.1128/JVI.75.20.9819-9827.2001
- Angel, J., M. A. Franco, y H. B. Greenberg (2008). Rotaviruses. En Encyclopedia of Virology (3 ^a ed., pp. 507-513) San Diego, CA, USA. : Academic Press
- Arias, C. F., Guerrero, C. A., Méndez, E., Zárate, S., Isa, P., Espinosa, R., Romero, P., y López, S. (2001). Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s). Novartis Foundation symposium, 238, 47–63. https://doi.org/10.1002/0470846534.ch4
- Arias, C. F., Isa, P., Guerrero, C. A., Méndez, E., Zárate, S., López, T., Espinosa, R., Romero, P., y López, S. (2002).
 Molecular biology of rotavirus cell entry. Archives of medical research, 33(4), 356–361. https://doi.org/10.1016/s0188-4409(02)00374-0
- Attoui, H., & Mertens, P. (2008). Template for Taxonomic Proposal to the ICTV Executive Committee. To create a new SubFamily in an existing Family. In International Committee on Taxonomy of Viruses. Recuperado 18 de junio de 2010, de International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV website: http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/vertebrate-2008/1221.aspx
- Ayala-Breton, C., Arias, M., Espinosa, R., Romero, P., Arias, C. F., y López, S. (2009). Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. Journal of virology, 83(17), 8819–8831. https://doi.org/10.1128/JVI.02308-08
- Benureau, Y., Huet, J. C., Charpilienne, A., Poncet, D., y Cohen, J. (2005). Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilization of outer capsid proteins. The Journal of general virology, 86(Pt 11), 3143–3151. https://doi.org/10.1099/vir.0.81045-0
- Blondel, D., Lahaye, X., Vidy, A., & Pomier, C. (2009). Compartimentalisation cellulaire viro-induite: agrésomes, inclusions virales et usines virales [Virus-induced compartimentalization: aggresomes, cytoplasmic inclusions and viral factories]. Virologie (Montrouge, France), 13(4), 201–214. https://doi.org/10.1684/13-4.2011.201-214-article-1
- Braschi, B., Omran, H., Witman, G. B., Pazour, G. J., Pfister, K. K., Bruford, E. A., & King, S. M. (2022). Consensus nomenclature for dyneins and associated assembly factors. The Journal of cell biology, 221(2), e202109014. https://doi.org/10.1083/jcb.202109014
- Brunet, J. P., Jourdan, N., Cotte-Laffitte, J., Linxe, C., Géniteau-Legendre, M., Servin, A., y Quéro, 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(22), 10801–10806. https://doi.org/10.1128/jvi.74.22.10801-10806.2000
- Burkhardt, J. K., Echeverri, C. J., Nilsson, T., y Vallee, R. B. (1997). Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. The Journal of cell biology, 139(2), 469–484. https://doi.org/10.1083/jcb.139.2.469
- Cabral-Romero, C., y Padilla-Noriega, L. (2006). Association of rotavirus viroplasms with microtubules through NSP2 and NSP5. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 101(6), 603–611. https://doi.org/10.1590/s0074-02762006000600006

- Campagna, M., Eichwald, C., Vascotto, F., y Burrone, O. R. (2005). RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. The Journal of general virology, 86(Pt 5), 1481–1487. https://doi.org/10.1099/vir.0.80598-0
- Carter, J. B., & Saunders, V. A. (2007). Virology: Principles and applications (1.^a ed., pp. 147–156). Chichester, England: John Wiley y Sons. Chichester, England: John Wiley y Sons.
- Chemello, M. E., Aristimuño, O. C., Michelangeli, F., y Ruiz, M. C. (2002). Requirement for vacuolar H+ -ATPase activity and Ca2+ gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. Journal of virology, 76(24), 13083–13087. https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.13083-13087.2002
- Cheung, W., Gill, M., Esposito, A., Kaminski, C. F., Courousse, N., Chwetzoff, S., Trugnan, G., Keshavan, N., Lever, A., y Desselberger, U. (2010). Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasms, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. Journal of virology, 84(13), 6782–6798. https://doi.org/10.1128/JVI.01757-09
- Chwetzoff, S., y Trugnan, G. (2006). Rotavirus assembly: an alternative model that utilizes an atypical trafficking pathway. Current topics in microbiology and immunology, 309, 245–261. https://doi.org/10.1007/3-540-30773-7_9
- Ciarlet, M., y Estes, M. K. (1999). Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. The Journal of general virology, 80 (Pt 4), 943–948. https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-4-943
- Ciarlet, M., Ludert, J. E., Iturriza-Gómara, M., Liprandi, F., Gray, J. J., Desselberger, U., y Estes, M. K. (2002). Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. Journal of virology, 76(8), 4087–4095. https://doi.org/10.1128/jvi.76.8.4087-4095.2002
- Clippinger, A. J., y Alwine, J. C. (2012). Dynein mediates the localization and activation of mTOR in normal and human cytomegalovirus-infected cells. Genes y development, 26(18), 2015–2026. https://doi.org/10.1101/gad.196147.112
- Cook, N., Bridger, J., Kendall, K., Gomara, M. I., El-Attar, L., y Gray, J. (2004). The zoonotic potential of rotavirus. The Journal of infection, 48(4), 289–302. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.01.018
- Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M. A., Greenberg, H. B., O'Ryan, M., Kang, G., Desselberger, U., y Estes, M. K. (2017). Rotavirus infection. Nature reviews. Disease primers, 3, 17083. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83
- D'Ambrosio, L., M. (2010). Investigating the higher-order protein interactions surrounding the stripak complex. Master of Science thesis, Department of Molecular Genetics, University of Toronto. Canada.
- Dahl, T. M., y Baehr, W. (2021). Review: Cytoplasmic dynein motors in photoreceptors. Molecular vision, 27, 506–517.
- de Matos, A. P., y Carvalho, Z. G. (1993). African swine fever virus interaction with microtubules. Biology of the cell, 78(3), 229–234. https://doi.org/10.1016/0248-4900(93)90134-z
- Delmas, O., Durand-Schneider, A. M., Cohen, J., Colard, O., y Trugnan, G. (2004). Spike protein VP4 assembly with maturing rotavirus requires a postendoplasmic reticulum event in polarized caco-2 cells. Journal of virology, 78(20), 10987–10994. https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.10987-10994.2004
- Desselberger, U., & Gray, J. (2009). Rotaviruses. En Principles and Practice of Clinical Virology (6.^a ed., pp. 337–353).
 Inglaterra.: John Willey and Sons Ldt. Inglaterra.: John Willey and Sons Ldt.
- Döhner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Vallee, R., y Sodeik, B. (2002). Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. Molecular biology of the cell, 13(8), 2795–2809. https://doi.org/10.1091/mbc.01-07-0348
- Eichwald, C., Arnoldi, F., Laimbacher, A. S., Schraner, E. M., Fraefel, C., Wild, P., Burrone, O. R., y Ackermann, M. (2012). Rotavirus viroplasm fusion and perinuclear localization are dynamic processes requiring stabilized microtubules. PloS one, 7(10), e47947. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047947
- Eichwald, C., Rodriguez, J. F., & Burrone, O. R. (2004). Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. The Journal of general virology, 85(Pt 3), 625–634. https://doi.org/10.1099/vir.0.19611-0

- Eichwald, C., Vascotto, F., Fabbretti, E., y Burrone, O. R. (2002). Rotavirus NSP5: mapping phosphorylation sites and kinase activation and viroplasm localization domains. Journal of virology, 76(7), 3461–3470. https://doi.org/10.1128/jvi.76.7.3461-3470.2002
- Estes, M. K., y Kapikian, A. Z. (2007). Rotaviruses. En Fields Virology (5.^a ed., pp. 1917–1976). Philadelphia, USA.
 Philadelphia, USA.
- Estes, M. K., y Greenberg, H. B. (2013). Rotaviruses. En Fields Virology (6.^a ed., pp. 1347–1401). Philadelphia, USA.
 Philadelphia, USA.
- Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F., y Burrone, O. R. (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. The Journal of general virology, 80 (Pt 2), 333–339. https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-333
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. A. (2005). Genus Rotavirus. En Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (pp. 484–496). San Diego, CA, USA: Elsevier. San Diego, CA, USA: Elsevier.
- Firestone, A. J., Weinger, J. S., Maldonado, M., Barlan, K., Langston, L. D., O'Donnell, M., Gelfand, V. I., Kapoor, T. M., y Chen, J. K. (2012). Small-molecule inhibitors of the AAA+ ATPase motor cytoplasmic dynein. Nature, 484(7392), 125–129. https://doi.org/10.1038/nature10936
- Gray, J., Vesikari, T., Van Damme, P., Giaquinto, C., Mrukowicz, J., Guarino, A., Dagan, R., Szajewska, H., & Usonis, V. (2008). Rotavirus. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 46 Suppl 2, S24–S31. https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31816f78ee
- Greber, U. F., y Way, M. (2006). A superhighway to virus infection. Cell, 124(4), 741–754. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.018
- Greenberg, H., McAuliffe, V., Valdesuso, J., Wyatt, R., Flores, J., Kalica, A., Hoshino, Y., y Singh, N. (1983). Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. Infection and immunity, 39(1), 91–99. https://doi.org/10.1128/iai.39.1.91-99.1983
- Hirokawa N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. Science (New York, N.Y.), 279(5350), 519–526. https://doi.org/10.1126/science.279.5350.519
- Hoshino, Y., & Kapikian, A. Z. (2000). Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. Journal of health, population, and nutrition, 18(1), 5–14.
- Hsieh, M. J., White, P. J., & Pouton, C. W. (2010). Interaction of viruses with host cell molecular motors. Current opinion in biotechnology, 21(5), 633–639. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.06.009
- Indran, S. V., Ballestas, M. E., & Britt, W. J. (2010). Bicaudal D1-dependent trafficking of human cytomegalovirus tegument protein pp150 in virus-infected cells. Journal of virology, 84(7), 3162–3177. https://doi.org/10.1128/JVI.01776-09
- Isa, P., Arias, C. F., & López, S. (2006). Role of sialic acids in rotavirus infection. Glycoconjugate journal, 23(1-2), 27–37. https://doi.org/10.1007/s10719-006-5435-y
- Jacquot, G., Maidou-Peindara, P., & Benichou, S. (2010). Molecular and functional basis for the scaffolding role of the p50/dynamitin subunit of the microtubule-associated dynactin complex. The Journal of biological chemistry, 285(30), 23019–23031. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.100602
- Jayaram, H., Estes, M. K., & Prasad, B. V. (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. Virus research, 101(1), 67–81. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.007
- Jolly, C. L., Beisner, B. M., Ozser, E., & Holmes, I. H. (2001). Non-lytic extraction and characterisation of receptors for multiple strains of rotavirus. Archives of virology, 146(7), 1307–1323. https://doi.org/10.1007/s007050170093
- 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(11), 8268–8278. https://doi.org/10.1128/JVI.71.11.8268-8278.1997

- Kajitani, N., Satsuka, A., Yoshida, S., & Sakai, H. (2013). HPV18 E1^E4 is assembled into aggresome-like compartment and involved in sequestration of viral oncoproteins. Frontiers in microbiology, 4, 251. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00251
- Kapikian A. Z. (1974). Acute viral gastroenteritis. Preventive medicine, 3(4), 535–542. https://doi.org/10.1016/0091-7435(74)90019-x
- Kapikian, A. Z., Cline, W. L., Greenberg, H. B., Wyatt, R. G., Kalica, A. R., Banks, C. E., James, H. D., Jr, Flores, J., & Chanock, R. M. (1981). Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay (IAHA): evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. Infection and immunity, 33(2), 415–425. https://doi.org/10.1128/iai.33.2.415-425.1981
- Kardon, J. R., & Vale, R. D. (2009). Regulators of the cytoplasmic dynein motor. Nature reviews. Molecular cell biology, 10(12), 854–865. https://doi.org/10.1038/nrm2804.
- Kirkwood C. D. (2010). Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. The Journal of infectious diseases, 202 Suppl, S43–S48. https://doi.org/10.1086/653548
- Kuta, A.; (2011) Investigation of subunits of the cytoplasmic dynein complex using novel mouse models. Doctoral thesis, UCL (University College London).
- Leopold, P. L., & Pfister, K. K. (2006). Viral strategies for intracellular trafficking: motors and microtubules. Traffic (Copenhagen, Denmark), 7(5), 516–523. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00408.x
- Li, Z., Baker, M. L., Jiang, W., Estes, M. K., & Prasad, B. V. (2009). Rotavirus architecture at subnanometer resolution. Journal of virology, 83(4), 1754–1766. https://doi.org/10.1128/JVI.01855-08
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Darnell, J., Zipursky, L., Scott, M. P., Krieger, M. & Matsudaira, P. (2005). Biología celular y molecular (pp. 829-839) (5.a ed.). PANAMERICANA.
- López, S., & Arias, C. F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. Trends in microbiology, 12(6), 271–278. https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.04.003
- Ludert, J. E., Feng, N., Yu, J. H., Broome, R. L., Hoshino, Y., & Greenberg, H. B. (1996). Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. Journal of virology, 70(1), 487–493. https://doi.org/10.1128/JVI.70.1.487-493.1996
- Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B. V., Cohen, J., & Rey, F. A. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. The EMBO journal, 20(7), 1485–1497. https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1485
- Martin, D., Duarte, M., Lepault, J., & Poncet, D. (2010). Sequestration of free tubulin molecules by the viral protein NSP2 induces microtubule depolymerization during rotavirus infection. Journal of virology, 84(5), 2522–2532. https://doi.org/10.1128/JVI.01883-09
- Matthijnssens, J., Otto, P. H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M., & Johne, R. (2012). VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. Archives of virology, 157(6), 1177–1182. https://doi.org/10.1007/s00705-012-1273-3
- Merino-Gracia, J., García-Mayoral, M. F., & Rodríguez-Crespo, I. (2011). The association of viral proteins with host cell dynein components during virus infection. The FEBS journal, 278(17), 2997–3011. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08252.x
- Mertens, P. P. C., Attoui, H. & Bamford, D. H. (s. f.). The RNAs and Proteins of dsRNA Viruses. www.reoviridae.org. Recuperado 7 de mayo de 2014, de https://www.reoviridae.org/dsRNA_virus_proteins/rotavirus%20figure.htm
- Novoa, R. R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H., & Risco, C. (2005). Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. Biology of the cell, 97(2), 147–172. https://doi.org/10.1042/BC20040058
- Parashar, U. D., Bresee, J. S., Gentsch, J. R., & Glass, R. I. (1998). Rotavirus. Emerging infectious diseases, 4(4), 561– 570. https://doi.org/10.3201/eid0404.980406

- Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresee, J. S., & Glass, R. I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. Emerging infectious diseases, 12(2), 304–306. https://doi.org/10.3201/eid1202.050006
- Parker, J. S., Broering, T. J., Kim, J., Higgins, D. E., & Nibert, M. L. (2002). Reovirus core protein mu2 determines the filamentous morphology of viral inclusion bodies by interacting with and stabilizing microtubules. Journal of virology, 76(9), 4483–4496. https://doi.org/10.1128/jvi.76.9.4483-4496.2002
- Patton, J. T., Silvestri, L. S., Tortorici, M. A., Vasquez-Del Carpio, R., & Taraporewala, Z. F. (2006). Rotavirus genome replication and morphogenesis: role of the viroplasm. Current topics in microbiology and immunology, 309, 169–187. https://doi.org/10.1007/3-540-30773-7_6
- Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Estes, M. K., & Prasad, B. V. (2006). Rotavirus proteins: structure and assembly. Current topics in microbiology and immunology, 309, 189–219. https://doi.org/10.1007/3-540-30773-7_7
- Pfister, K. K., Fisher, E. M., Gibbons, I. R., Hays, T. S., Holzbaur, E. L., McIntosh, J. R., Porter, M. E., Schroer, T. A., Vaughan, K. T., Witman, G. B., King, S. M., & Vallee, R. B. (2005). Cytoplasmic dynein nomenclature. The Journal of cell biology, 171(3), 411–413. https://doi.org/10.1083/jcb.200508078
- Pfister, K. K., & Lo, W.-H. (2012). Cytoplasmic Dynein Function Defined by Subunit Composition. En Dyneins: Structure, Biology and Disease (1.^a ed., pp. 425–439). London. London.
- Pfister, K. K., Shah, P. R., Hummerich, H., Russ, A., Cotton, J., Annuar, A. A., King, S. M., y Fisher, E. M. (2006). Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families. PLoS genetics, 2(1), e1. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020001
- Ramanathan, H. N., Chung, D. H., Plane, S. J., Sztul, E., Chu, Y. K., Guttieri, M. C., McDowell, M., Ali, G., & Jonsson, C. B. (2007). Dynein-dependent transport of the hantaan virus nucleocapsid protein to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. Journal of virology, 81(16), 8634–8647. https://doi.org/10.1128/JVI.00418-07
- Ramanathan, H. N., & Jonsson, C. B. (2008). New and Old World hantaviruses differentially utilize host cytoskeletal components during their life cycles. Virology, 374(1), 138–150. https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.12.030
- Sato, K., Inaba, Y., Miura, Y., Tokuhisa, S., & Matumoto, M. (1982). Antigenic relationships between rotaviruses from different species as studied by neutralization and immunofluorescence. Archives of virology, 73(1), 45–50. https://doi.org/10.1007/BF01341726
- Schroer T. A. (2004). Dynactin. Annual review of cell and developmental biology, 20, 759–779. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.012103.094623
- Shaw, R. D., & Greenberg, H. B. (1999). Rotaviruses (Reoviridae). En Encyclopedia of Virology (2.^a ed., pp. 1576–1592). San Diego, CA, USA. : Academic Press.
- Sodeik B. (2000). Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. Trends in microbiology, 8(10), 465-472. https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01824-2
- Taraporewala, Z. F., & Patton, J. T. (2004). Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. Virus research, 101(1), 57–66. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.006
- Wadzinski, T. (2006). Light Intermediate Chain 1: a Multifunctional Cargo Binder for Cytoplasmic Dynein 1. Doctoral Thesis. University of Massachusetts Medical School.
- Wentz, M. J., Patton, J. T., & Ramig, R. F. (1996). The 3'-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. Journal of virology, 70(11), 7833–7841. https://doi.org/10.1128/JVI.70.11.7833-7841.1996
- Wyatt, R. G., Greenberg, H. B., James, W. D., Pittman, A. L., Kalica, A. R., Flores, J., Chanock, R. M., & Kapikian, A. Z. (1982). Definition of human rotavirus serotypes by plaque reduction assay. Infection and immunity, 37(1), 110–115. https://doi.org/10.1128/iai.37.1.110-115.1982
- Yadav, S., & Linstedt, A. D. (2011). Golgi positioning. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 3(5), a005322. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005322