

ESTUDIO DE LA MORFOGENESIS DE ROTAVIRUS UTILIZANDO MICROSCOPIA ELECTRONICA Y siRNAs.

José Luis Zambrano¹, Ferdinando Liprandi¹ y Juan Ernesto Ludert².

¹ Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela; ²Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados-IPN, México, D.F. México. Correo electrónico: jludert@cinvestav.mx

Los rotavirus, miembros de la familia *Reoviridae*, son la principal causa de diarreas severas en niños menores de 5 años. El virión, desprovisto de envoltura lipídica, está compuesto por 3 capas concéntricas de proteínas que encierran el genoma viral compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena. Cada segmento codifica por una proteína viral (excepto el segmento 11) entre ellas 6 proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y 5 no estructurales (NS1, NS2, NS3, NS4, NS5). La morfogénesis de los rotavirus ocurre enteramente en el citoplasma y en estrecha asociación con el retículo endoplasmático rugoso (RER). En este trabajo se utilizaron siRNAs para el silenciamiento de la proteína no estructural NSP4 y de las proteínas estructurales VP4 y VP7, a fin de evaluar la participación de estas proteínas en la morfogénesis y la maduración del virus. Los 3 interferentes utilizados mostraron ser capaces de reducir la expresión de las proteínas blanco en más de un 90%, según ensayos de western blot. Asimismo, utilizando ensayos de placa se observó que los siRNA interferentes eran capaces de reducir la progenie viral en al menos un 98%. No se observó ningún efecto sobre la progenie viral al utilizar, a manera de control negativo, el siRNA anti lamina A/C. Para los estudios de microscopía electrónica, las monocapas de células MA104 se inocularon con rotavirus a una M.O.I de 10, luego de 36 horas de transfección con los siRNAs. Las células fueron fijadas a las 7 h.p.i. en glutaraldehído al 0,2% en 0.1 M buffer cacodilato (pH 6.7) y post fijadas en OsO₄ al 2%. Las células fijadas fueron incluidas en resina Epóxica y las secciones teñidas con acetato de uranilo al 2% antes de ser observadas en un microscopio Phillips CM10. En las células transfectadas con el siRNA control, se observó la presencia de viroplasmos o factorías virales en el citoplasma de la célula, adosados al RER, así como la gemación de partículas inmaduras, formadas en los viroplasmos, desde el citoplasma hacia el lumen del RER. Las cisternas del RER se observaron expandidas y en su interior se observaron partículas inmaduras envueltas, así como partículas maduras sin envoltura lipídica. Las células silenciadas para NSP4, mostraron viroplasmos de tamaño considerablemente reducido y libres en el citoplasma, así como la presencia de partículas inmaduras libres en el citoplasma. Estos resultados confirman la importancia de la proteína NSP4 para el anclaje de los viroplasmos al RER y para la translocación de las partículas inmaduras al interior del mismo. Las células en donde la expresión de la proteína VP7 fue interferida, mostraron una acumulación de partículas inmaduras envueltas, sugiriendo que la presencia de la proteína VP7 es necesaria para la remoción de la envoltura lipídica y posterior maduración del virus. Finalmente, en ausencia de la proteína VP4, se observaron viroplasmos normales y procesos de gemación normales, pero se observaron arreglos paracrystalinos dentro del RER formados por la agregación de partículas virales. Estos resultados indican que las proteínas NSP4, VP7 y VP4 son requeridas en distintos momentos a lo largo del proceso de morfogénesis del virión. Además, muestran que la microscopía electrónica, en combinación con el uso de siRNAs, es una herramienta poderosa para el estudio de la función de las proteínas virales.