

Estudio del posible papel de la vía endocítica en la internalización del virus de la bursitis infecciosa aviar (IBDV)

V. Di Francesco¹, M. F. Quevedo¹, M. C. Giménez¹, M. I. Colombo^{1,2} y L. R. Delgui^{1,2}

Recursos humanos en formación: V. Di Francesco, M. C. Giménez y M. F. Quevedo

¹Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Juan Agustín Maza

²Instituto de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas.

UNCuyo-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

ldelgui@fcm.uncu.edu.ar

Resumen

La endocitosis es un proceso mediante el cual porciones de la membrana plasmática y material extracelular son internalizados en las células. Esta vía constituye el mecanismo mayormente utilizado por los agentes virales para ingresar a aquéllas. Luego de ser endocitados, diversos virus requieren ser transportados hacia compartimentos acídicos para completar su penetración y replicación dentro de la célula. El virus de la bursitis infecciosa o IBDV (Infectious Bursal Disease Virus) es un importante patógeno aviar perteneciente a la familia *Birnaviridae*, cuyo genoma está compuesto por ácido ribonucleico de cadena doble (dsRNA). Hemos iniciado el estudio del posible papel de la vía endocítica en el ciclo de replicación del IBDV, dado que varios antecedentes sugieren que éste podría requerir la maquinaria de la endocitosis en su ciclo de replicación.

Objetivo

Realizar ensayos preliminares que arrojen luz sobre cuál podría ser el mecanismo de entrada involucrado en la internalización del IBDV en las células hospedadoras.

Metodología

En primer lugar hemos analizado el papel de las proteínas de endosomas tempranos Rab5 y de endosomas tardíos Rab7 en la infección por el virus. Para eso, se sobreexpresaron esas proteínas fusionadas a la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP o Enhanced Green Fluorescent Protein) en células HeLa. Estudios previos han demostrado que la sobreexpresión de Rab5 produce un aumento en la tasa de endocitosis en las células transfectadas, por lo tanto analizamos su efecto en la infección por el virus. Como control se utilizó la sobreexpresión de la proteína EGFP solamente.

Las células fueron infectadas con una suspensión conteniendo 1 Plaque Forming Unit (PFU)/célula de una preparación de viriones y los cultivos fueron incubados durante 36 horas a 37°C. El porcentaje de células infectadas fue analizado mediante microscopía confocal. Así, se pudo observar un aumento significativo en el número de células infectadas en aquellas que sobreexpresan la proteína EGFP-Rab5wt y -Rab7wt con relación a las que sobreexpresan sólo la proteína EGFP, lo que constituye un indicio de la utilización de la vía endocítica por parte del virus.

En una segunda etapa analizamos si la acidificación de los endosomas es un requerimiento para la entrada del IBDV a las células hospedadoras. Para eso utilizamos inhibidores de la acidificación endosomal, como el cloruro de amonio (NH₄Cl) y la Bafilomicina A. El NH₄Cl es una base débil que neutraliza el pH de las vesículas ácidas intracelulares, mientras que la Bafilomicina A es un inhibidor específico de la bomba ATPásica de H⁺ vacuolar. Cultivos de células HeLa fueron tratados con los inhibidores e infectados con el IBDV. Se determinó mediante microscopía confocal el porcentaje de células infectadas en células tratadas con relación a las sin tratar. Se ha podido observar que ambos inhibidores de la acidificación intravesicular causaron una marcada reducción del porcentaje de células infectadas con el virus.

Resultados

Los datos preliminares obtenidos constituyeron sólidos indicios acerca de la participación de la vía endocítica en la internalización del IBDV en las células hospedadoras. Además, estos resultados forman parte del primer estudio de la vía involucrada en el ingreso de estas partículas virales a las células.