



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Identificación de marcadores de muerte celular que produce rotavirus WTEW en líneas tumorales REH y U937

Catalina Castaño Toro

Código: 05599246

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Bioquímica

Bogotá D.C; Colombia

2014

Identificación de marcadores de muerte celular que produce rotavirus WTEW en líneas tumorales REH y U937

Catalina Castaño Toro

Código: 05599246

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Bioquímica

Director:

Carlos Arturo Guerrero Fonseca MD. MSc. PhD.

Línea de investigación:

Virus Oncolíticos

Grupo de investigación:

Biología Molecular de virus

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Bioquímica

Bogotá

2014

A mi familia por su apoyo incondicional, amor y palabras de aliento, a mi esposo por la comprensión, paciencia y por ayudarme en el proceso, a mi bebe Jerónimo por darme las fuerzas para continuar a pesar de las dificultades y por enseñarme a valorar el tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Al alcanzar esta nueva meta es inevitable no sentirse orgulloso y pensar en el esfuerzo que representó el lograrla, nos sentimos eufóricos y recordamos con gratitud a todos quienes participaron en este proceso, llegando así el momento de los agradecimientos.

Agradezco muy especialmente a mi director de tesis el Dr. Carlos Arturo Guerrero Fonseca por su orientación, seguimiento pero sobre todo por su apoyo y paciencia. A mis profesores Dr. Luis Alberto Gómez Grosso, Orlando Acosta Losada y mi director de tesis, quienes me han orientado, apoyado y corregido en mi proceso de formación en la Maestría en Bioquímica, mostrando un interés y una dedicación que me han confirmado que los grandes maestros son “grandes” por su conocimiento pero son “excelsos” por transmitirlo a quienes tenemos el honor de ser sus alumnos.

También deseo agradecer a mi familia por su apoyo, paciencia, amor y por el ánimo que me brindaron. Agradezco igualmente a mis compañeros del laboratorio y de la maestría por su apoyo y palabras de aliento y a Miguel Ospino Márquez por su colaboración en el suministro de materiales de laboratorio.

A todos ellos muchas gracias

RESUMEN

ANTECEDENTES

El cáncer es la principal causa de muerte en países industrializados y segunda causa de muerte en países en vía de desarrollo. El número de pacientes con cáncer diagnosticado entre los años 2004 y 2008 fue de 28.8 millones [1, 2]. En la actualidad se intentan desarrollar diferentes tratamientos que incluyen la viroterapia oncolítica, en la cual los virus pueden ser utilizados en su estado silvestre, ser modificados genéticamente, pueden ser diseñados para depender de vías de señalización o programas de transcripción que se activan en células tumorales. Otros son diseñados teniendo en cuenta el proceso de entrada del virus a la célula y son modificados para que utilicen receptores celulares que solo se expresan en células tumorales [3]. Este enfoque ofrece seguridad en cuanto es específico de tumor, pero a la vez es una limitante porque el virus es específico solamente para los tumores que tengan dicho receptor celular. En la actualidad no se ha diseñado un virus con capacidad de actuar en los diferentes tipos de tumor o en todas las células que hacen parte de un tumor, incluso en tratamientos combinados con radioterapia y quimioterapia, debido a que los tejidos y cada una de las células tumorales presentan procesos biológicos y bioquímicos complejos. Según las consideraciones de la “Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)” es necesario primero caracterizar el virus oncolítico y para esto se requiere evaluar su selectividad, para lo cual necesita de ensayos de citotoxicidad in vitro y/o replicación en líneas celulares permisivas (tumorales) y en no permisivas (células normales).

Rotavirus tiene la capacidad de infectar líneas celulares de cáncer como se ha demostrado en células Caco 2 [4] y células HT-29 [5] de adenocarcinoma colorrectal. En trabajos previos en el laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de medicina de la Universidad Nacional, se encontró que al evaluar las células de la línea Sp2/0-Ag14de y U937 infectadas por rotavirus presentan permeabilidad de la membrana citoplasmática, se encuentran señales de inducción de muerte celular por apoptosis y disminuye el número de células durante el proceso infeccioso, sugiriendo que la infección viral trae como consecuencia primero apoptosis y luego lisis celular. Existen reportes de que la infección por el rotavirus induce muerte celular por apoptosis en las células intestinales humanas Caco-2 [6] y oncosis en células MA104 al inducir alteración en la integridad de la membrana citoplasmática, sin ocasionar fragmentación del DNA o formación de cuerpos apoptóticos [7]. Se ha reportado que la proteína rotaviral NSP1 suprime en las primeras 8 h.p.i. la muerte celular prematura por apoptosis, activando señales de supervivencia vía PI3K y después de esta h.p.i. la célula muere por apoptosis [8]. Igualmente, en trabajos previos de nuestro laboratorio se halló que las cepas de rotavirus seleccionadas en el laboratorio infectan y lisan la línea celular Sp40 Ag-14 (mieloma de ratón), U-937 (linfoma histiocítico), REH (leucemia linfocítica aguda), Kato III (carcinoma gástrico), J774 (sarcoma de células reticulares), MDA (adenocarcinoma de seno), PC3 (adenocarcinoma grado IV de próstata), sugiriendo que las cepas estudiadas son potenciales virus oncolíticos. Sin embargo, las señales de inducción de muerte celular por apoptosis encontradas en estas líneas tumorales analizadas, fue al cabo de 12 horas post-infección. Por lo cual hay evidencias preliminares que sugieren lisis celular por mecanismos

apoptóticos, pero no se ha profundizado en determinar a cuanto tiempo de la infección se inician las señales de muerte, ni se han precisado los eventos bioquímicos característicos de muerte celular en líneas U937 y REH infectadas con rotavirus WTEW, ni la relación con la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO - ROS) y si estos efectos se modifican al aplicar antioxidantes en líneas U937 y REH infectadas con rotavirus WTEW.

OBJETIVO: Determinar marcadores de muerte celular en líneas U937 y REH infectadas con rotavirus WTEW.

MATERIALES Y MÉTODOS: Las líneas U937 y REH se infectaron con rotavirus WTEW con un MOI de 2, se analizó la presencia de antígenos rotavirales usando anticuerpos contra proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus mediante inmunocitoquímica. Se evaluó la exposición de la fosfatidilserina, la fragmentación con tinciones de Hoescht e Ioduro de propidio y rupturas del DNA con las técnicas de TUNEL y PARP, pérdida de potencial de membrana mitocondrial con el marcador DiOC 6, la actividad metabólica utilizando ensayos de MTT y Resazurina, niveles de ROS con el DHE del kit Cellomics® Oxidative Stress I. La expresión de las proteínas celulares IKB, COX, NFkB, PPAR γ , HSP90 y PDI por inmunofluorescencia.

RESULTADOS: Encontramos que las líneas U937 y REH se infectaron con rotavirus. Se promovieron marcadores de muerte celular asociados con apoptosis como la exposición de fosfatidil serina a las 11 h.p.i., aumento de la fragmentación, rupturas del DNA, activación de mecanismos de reparación, disminución del potencial de membrana mitocondrial. Se identificó que la actividad metabólica no disminuye en las primeras h.p.i., y su disminución es dependiente del MOI con que son infectadas. Los niveles de ROS aumentan en células de la línea U937 cuando son infectadas y disminuyen en células pre-tratadas con N-acetilcisteína, Tiazonilediona, Rosiglitazona, Pioglitazona y Curcumina, en la línea REH los niveles disminuyen en células infectadas cuando son pre-tratadas con N-acetilcisteína y Tiazonilediona. Los niveles de infección disminuyen en células REH y U937 cuando son pretratadas con todos los medicamentos. Se encontró que en células REH la expresión de las proteínas celulares IKB, COX, NFkB, PPAR γ , HSP90 y PDI no varían entre las células infectadas con rotavirus WTEW y las células infectadas y tratadas con NAC, mientras en células de la línea U937 se presenta disminución significativa en las proteínas IKB, NFkB fosforilado y COX II cuando las células son infectadas y tratadas con NAC.

CONCLUSIÓN: La infección del rotavirus WTEW a las células REH y U937 induce marcadores de muerte celular característicos de apoptosis.

PALABRAS CLAVE: Rotavirus, oncolítico, muerte celular, N-acetilcisteína, REH, U937, especies reactivas de oxígeno.

ABSTRACT

BACKGROUND

Cancer is the leading cause of death in industrialized countries and the second cause of death in developing countries. The number of patients with cancer diagnosed between 2004 and 2008 was 28.8 million [1, 2]. Nowadays, science is trying to develop several treatments including the oncolytic virus therapy, in which the virus can be used in its natural state, be genetically modified, be designed to depend on signaling pathways and transcriptional programmes that are activated in tumor cells. Other are designed taking into account the process of virus entry into cells and are modified to use only expressed on the tumour cell surface receptors [3]. This approach provides certainty as it is specific to tumor, but also is a limitation because the virus is specific only for tumors that have this cellular receptor. At present there has not been designed a virus capable of acting on the various types of tumor or in all cells which are part of a tumor, even in therapy combined with radiation and chemotherapy, because tissue and each of the tumor cells have complex biochemical and biological processes. According to the considerations of the "Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)" it is necessary to characterize the oncolytic virus and this requires assessment its selectivity, for which it needs testing in vitro cytotoxicity and / or replication in permissive (tumour) and nonpermissive (normal) cells lines.

Rotavirus is able of infecting cancer cell lines as it has been demonstrated in Caco 2 cells [4] and HT-29 cells [5] of colorectal adenocarcinoma. In previous works in the laboratory Virus Molecular Biology from the National University of Colombia, it was found that when evaluating cells Sp2/0-Ag14 and U937 lines infected by rotavirus have permeability of the cytoplasmic membrane, there are signs of induction of apoptosis cell death and decreases the number of cells during the infectious process, suggesting that the viral infection results first in apoptosis, then cell lysis. There are reports that rotavirus infection induces apoptotic cell death in the human intestinal Caco-2 cells [6] and oncosis in MA104 cells to induce alteration in the citoplasmatic membrane integrity without DNA fragmentation and formation of apoptotic bodies [7]. It has been reported that rotavirus NSP1 protein supresses for the first 8 hpi premature cell death by apoptosis by activating survival pathways PI3K and after this hpi the cell dies by apoptosis [8]. Also, in previous work from our laboratory was found to rotavirus strains selected in the laboratory infect and lyse the cell line SP40 Ag-14 (mouse myeloma), U-937 (histiocytic lymphoma), REH (acute lymphocytic leukemia) Kato III (gastric carcinoma), J774 (reticulum cell sarcoma), MDA (breast adenocarcinoma), PC3 (prostate adenocarcinoma grade IV), suggesting that the strains studied are potential oncolytic virus. However, the signals of cell death induction by apoptosis found in these tumor lines tested were found 12 hours post-infection. Therefore there is preliminary evidence suggesting cell lysis by apoptotic mechanisms, but has not been analyzed to determine how long the infection death signals are initiated or has clarified the characteristic biochemical events of cell death in lines U937 and REH infected with WTEW rotavirus or the connection with the production

of reactive oxygen species (ROS) and if these purposes are modified by applying antioxidants in U937 and REH lines infected by WTEW rotavirus.

OBJETIVO: Determining markers of cell death in REH and U937 cell lines infected with WTEW rotavirus.

MATERIALS AND METHODS: REH and U937 cell lines were infected with WTEW rotavirus with an MOI 2, the presence of rotaviral antigens was analyzed using antibodies against structural and nonstructural proteins of rotavirus by immunochemistry. Phosphatidylserine exposure was analyzed, DNA fragmentation with Hoescht and propidium iodide stains, DNA breaks with TUNEL and PARP techniques, loss of mitochondrial membrane potential with DiOC6 dye, the metabolic activity using MTT and resazurin assays, ROS levels with DHE from kit Cellomics® Oxidative Stress I. Expression of cellular proteins IKB, COX, NFkB, PPAR γ , HSP90 y PDI by immunofluorescence.

RESULTS: We found that REH y U937 cell lines were infected with rotavirus. Markers of cell death associated with apoptosis such as Phosphatidylserine exposure at 11 h.p.i., increased fragmentation and breaks of DNA, activation repair mechanisms, decreased mitochondrial membrane potential were induced. It was also found that the cellular metabolic activity not reduced in the first h.p.i. and its reduction is dependent of the MOI with which they are infected. ROS levels are increased in U937 cell line when infected and decrease when are treated with N-acetyl cysteine (NAC), thiazolidinedione, rosiglitazone, pioglitazone and curcumin, on the REH line cell levels decline in infected cells when they are treated with NAC and thiazolidinedione. Infection levels decreased in REH and U937 cell lines when are pre-treated with all medications. It was found that in REH cells the expression of cellular proteins IKB, COX, NFkB, PPAR γ , HSP90 y PDI not vary between cells infected with WTEW rotavirus and the infected cells and treated with NAC, while on U937 cell line current significant decreased in IKB, NFkB phosphorylated and COX II when cells are infected and treated with NAC

CONCLUSION: WTEW rotavirus infection of REH and U937 cell lines induces cell death markers characteristic of apoptosis.

KEYWORDS: Rotavirus, oncolytic, cell death, N-acetyl cysteine, REH, U937, reactive oxygen species.

CONTENIDO

	Pág.
Lista de símbolos y abreviaturas	12
Lista de figuras	15
Lista de tablas	15
Lista de anexos	16
1. Introducción	18
2. Marco conceptual	19
2.1. Virus oncolíticos	19
Virus oncolíticos modificados en el laboratorio	25
2.1.1. Consideraciones para el desarrollo clínico de virus oncolíticos	27
2.2. Rotavirus	29
2.2.1. Epidemiología	31
2.2.2. Proteínas estructurales	31
2.2.3. Proteínas no	32
2.2.4. Entrada del virus a la célula	34
2.2.5. Ciclo replicativo	35
2.2.6. Rotavirus y muerte celular	36
2.3. Factor Nuclear Kappa b (NFκB) y especies reactivas de oxígeno	37
2.3.1. Vía de señalización NFκB	37
2.3.2. NFκB y cáncer	39
2.3.3. Especies reactivas de oxígeno	39
2.3.4. Especies reactivas de oxígeno y cáncer	40
2.3.5. Relación vía NFκB especies reactivas de oxígeno	41
2.4. Muerte celular	42
2.4.1. Apoptosis	43
2.4.2. Necrosis	45
2.5. Proteínas Celulares	46
2.5.1. Proteína de choque térmico 90 (HSP90)	46
2.5.2. Peroxisome proliferator- activated receptor- γ (PPAR γ)	47

	10
2.5.3. Proteína disulfuro isomerasa (PDI)	48
3. Formulación del problema	50
4. Justificación	51
5. Objetivos	52
5.1.1. Objetivo general	52
5.1.2. Objetivos específicos	52
6. Materiales y Métodos	52
6.1. Líneas celulares	52
6.2. Anticuerpos y reactivos	53
6.3. Cepas de rotavirus	54
6.4. Técnicas utilizadas	55
6.4.1. Infección de células U937 y REH	55
6.4.2. Inmunocitoquímica	55
6.4.3. Anexina V	56
6.4.4. 7- aminoactinomycin D (7-AAD)	56
6.4.5. Fragmentación de DNA	57
6.4.6. Poli (ADP – ribosa)-polimerasa	57
6.4.7. TUNEL (TdT- mediated dUTP Nick end labeling) assay	58
6.4.8. Dihydroethidium DHE	58
6.4.9. 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC ₆ (3))	59
6.4.10. Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)	59
6.4.11. Resazurina	60
6.4.12. Expresión proteínas celulares	60
6.5. Análisis estadístico	62
7. Resultados	63
7.1. El rotavirus infecta, se replica y produce viriones en las líneas REH y U937	63
7.2. La infección por rotavirus produce alteración de la membrana citoplasmática y disminuye la viabilidad celular dependiendo de la línea celular	65
7.3. La infección por aislamiento de rotavirus WTEW en líneas celulares REH y U937 induce cambios en el patrón de distribución de la cromatina	67

7.4. La infección por aislamiento de rotavirus WTEW induce rupturas en el DNA y activación de mecanismos de reparación del DNA	70
7.5. La infección por aislamiento de rotavirus WTEW induce pérdida de potencial de membrana mitocondrial y causa cambios en actividad metabólica celular dependiente del MOI	75
7.6. La infección por rotavirus WTEW, en células de las líneas REH y U937 induce incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS, EROs) y se reducen al tratar con inhibidores de la vía NFκB	80
7.7. La expresión de las proteínas celulares COX, NFκB fosforilado, IκB, PPARγ, PDI y HSP90 se modifica al tratar con NAC células U937 infectadas con rotavirus WTEW	85
7.8. La fragmentación del DNA y su reparación se modifica al tratar con NAC las células REH y U937 infectadas con rotavirus WTEW	89
8. Discusión	93
9. Conclusión	98
10. Recomendaciones	98
Bibliografía	99
Anexos	114

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

VOs: Virus Oncolíticos
HSV: Herpes Simplex Virus
PSA: Antígeno específico de próstata (Prostate Specific Antigen)
GM-CSF: Factor estimulante de colonias granulocitos macrófago (Granulocyte Macrophage Colony- Stimulating Factor)
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidermal (epidermal growth factor receptor).
NDV: Virus de la enfermedad de Newcastle
RNA: Ácido ribonucleico
POC: Prueba de concepto farmacológico
PCR: Reacción en cadena a la Polimerasa
TLP: Partícula viral de triple capa.
VP: Viral Protein
DLP: Partícula viral doble capa
SLP: Partícula viral capa simple
PFU: Unidades formadoras de placa
DL: Dosis letal
NSP: Proteína no estructural.
IRF: Factor regulador de interferon
NTPasa: Nucleótido trifosfatasa
NTP: Nucleótido trifosfato
NDP: Nucleótido difosfato
RNA_m: RNA mensajero.
PDB: Protein Data Bank
eIF-4GI: Factor de iniciación de traducción 4GI (Translation Initiation Factor 4GI)
aa : aminoácidos
RE: Retículo Endoplásmico
MA104: Línea celular embrionaria de riñón de mono verde
AS: Acido Siálico
RHD: Rel Homology Domain
NF- κB: Factor nuclear κB
NLS: Secuencia conservada de localización nuclear (Nuclear Localization Sequence)
IκB: Inhibitor of Kappa B
NES: Secuencia de exportación nuclear (Nuclear Export Signal)
TNFα: Factor de necrosis tumoral α
IL: Interleukina
LPS: Lipolisacarido
TCR: Receptores tipo Toll (Toll Like Receptor)
IKK: IκB kinase
Ser: Serina
IKKK: IKK Kinase
LMP1: Proteína latente de membrana 1 (Latent Membrane Protein 1)
NIK: NF-κB Inducing Kinase
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible (inducible oxide nitric synthase)

COX-2: Ciclooxygenasa 2
IAP: Inhibidores de apoptosis celular (Inhibitors of Apoptosis Proteins)
DNA: Ácido desoxirribonucleico especies reactivas de oxígeno (ROS)
PDI: Proteína disulfuro isomerasa
Nox: NADPH oxidasas
MnSOD: Manganese Superoxide Dismutase
Cu, Zn- SOD: Cobre – Zinc Superoxide Dismutase
XOR: Xanthine Oxidoreductase
NAD: Nicotinamide Adenine Dinucleotide
PGH₂: Prostaglandina H₂
NCCD: Nomenclature Committee on Cell Death
REH: Línea celular REH de leucemia linfocítica aguda
U-937: Línea celular de linfoma histiocítico humano
ICH: Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
Sp40 Ag-14: Línea celular de mieloma murino
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's médium
h.p.i: Horas postinfección
HRP: Peroxidasa de rábano picante
DHE: Dihydroethidium
NAC: N-acetyl-cysteine
UNAM: Universidad Autónoma de México
RRV: Rotavirus de mono Rhesus.
TRUY: Aislamiento rotaviral producto de mezclar las cepas TRF, RRV, UK y YM
WWM: Aislamiento rotaviral producto de mezclar las cepas Wa, Wi y M69.
Wt1-5: Aislamiento rotaviral producto de mezclar las cepas TRF, RRV, UK y YM.
WTEW: Aislamiento rotaviral producto de mezclar las cepas WWM, TRUY, ECwt y Wt1-5.
ECwt: Cepa de rotavirus murino.
SFB: Suero fetal bobino
PBS: Buffer fosfato salino.
IgG: Inmunoglobulina G
AEC: Aminoetilcarbazol
DiOC6 (3): 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide
Cys: Cysteine
PKAc: Protein Kinase A catalytic subunit
PI3K: Phosphoinositide 3 Kinase
NEMO: NF- κB essential modulator
CARD: Dominio de reclutamiento activación de caspasa (Caspase Activation Recruitment Domain)
DED: Dominio efector de muerte (Death Effector Caspase)
UV: Ultravioleta
PPAR γ: Peroxisome Proliferator–Activated Receptor-γ
TZDs: Thiazolidinediones
PDI: Proteína disulfuro isomerasa.
HIV: Human Inmunodeficiency Virus
PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog
TMX: Proteína transmembrana relacionada con tioredoxina (Thioredoxin Related Transmembrane protein)
ERp18: Endoplasmic Reticulum resident Protein 18 kDa

PDip: Human pancreas-specific protein disulfide-isomerase
PDIr: Proteína relacionada con Proteína Disulfuro Isomerasa
PARP: Poli ADP Ribosa Polimerasa
XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein
APAF1: Apoptotic Protease-Activating Factor 1
BID: BCL-2 homology 3 (BH3)-interacting domain death agonist
PMEM: Permeabilización de membrana externa mitocondrial
MEM: membrana mitocondrial externa
BCL-2: B- cell lymphoma 2
BCL-XI: B- cell lymphoma 2 extra large
SMAC DIABLO: SMAC- Second Mitochondria-derived Activator of Caspases and DIABLO (Direct IAP-Binding protein with Low PI
ATCC: American type culture collection.
EGF: factor de crecimiento epidermal.
HSPs: Proteínas de choque térmico.
HSP90: Proteína de choque térmico 90
TNFR1: TNF Receptor 1
ATP: Adenosine Triphosphate
AIF: Factor de inducción de apoptosis (Apoptosis Inducing Factor)
TRADD: Dominio de muerte asociado a TNFR (Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain)
FADD: Proteína dominio de muerte asociada a FAS (Fas-Associated Death Domain)
RIP1 (RIPK1): proteína de unión a receptor 1 (kinases Receptor-Interacting Protein 1
SHRs: Receptores de hormona esteroidea (Steroid Hormone Receptors)
TRAILR1: Receptor de ligando que induce apoptosis relacionado con TNF 1 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1)
FASL: Fas Ligando
HSF1: Factor de transcripción de choque térmico 1 (Heat Shock Factor 1)
HT29: Línea celular de adenocarcinoma colorectal de humano
PC3: Línea celular de adenocarcinoma grado IV de próstata
MCF-7: Línea celular de adenocarcinoma de seno/glándula mamaria.
BAD: BCL-2 antagonist of the cell death
NDUFB8: NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) 1 Beta subcomplex 8
FAS: Receptor de la superfamilia de receptores TNF, miembro 6

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Estructura de rotavirus a través de microscopía electrónica	30
Figura 2: Ubicación de las proteínas estructurales en la partícula viral	33
Figura 3: Rotavirus WTEW infecta, se replica y produce viriones en células de líneas REH y U937	64
Figura 4: La infección por rotavirus produce alteración de la membrana citoplasmática y no genera permeabilidad de la membrana citoplasmática	66
Figura 5: La infección por rotavirus WTEW en líneas celulares REH y U937 induce cambios en el patrón de distribución de la cromatina	69
Figura 6: La infección por rotavirus WTEW induce rupturas en el DNA y activación de mecanismos de reparación del DNA	73
Figura 7: La infección por rotavirus WTEW induce pérdida de potencial de membrana mitocondrial y causa cambios en actividad metabólica celular dependiente del MOI	78
Figura 8: La infección por rotavirus WTEW induce la producción de especies reactivas de oxígeno	81
Figura 9: En las células de las líneas REH y U937 infectadas con rotavirus WTEW los niveles de ROS y de antígenos virales se reducen con el tratamiento con inhibidores de la vía NFκB Tiazonilediona, Rosiglitazona, Pioglitazona y Curcumina o con NAC	84
Figura 10: Infección de células con aislamiento rotaviral WTEW y tratamiento con NAC induce disminución en los niveles de proteínas celulares COX, NFκB fosforilado, IκB, PPARγ, PDI y HSP90 dependiendo de la línea celular	87
Figura 11: El tratamiento con NAC en células infectadas con rotavirus WTEW no disminuyen los niveles de fragmentación del DNA, reacción de TUNEL y presencia de PARP en células de las líneas REH y U937	91

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Mecanismo Anti-tumoral de virus oncolíticos	19
Tabla 2: Pruebas de viroterapia oncolítica completados recientemente y en desarrollo	22
Tabla 3: Reactivos utilizados	53

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Tabla porcentajes de infección de antígenos virales, evaluando proteínas estructurales y no estructurales mediante inmunocitoquímica	114
Anexo 2: Tabla porcentajes de células de las líneas REH y U937 con alteración de la membrana citoplasmática evaluadas con Anexina V y 7-aminoactinomycin D (7-AAD)	115
Anexo 3: Tabla porcentajes de células de las líneas REH y U937 con fragmentación del DNA evaluadas mediante tinción de Hoescht a. Comparación células a diferentes h.p.i. vs no infectadas, b. Comparación del valor de cada h.p.i. vs la h.p.i. anterior	116
Anexo 4: Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus en células infectadas con rotavirus WTEW e inmunofluorescencia de cambios en el patrón de distribución de la cromatina evaluado con Hoescht a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i., a. REH, b. U937	117
Anexo 5: Tabla porcentajes de células de las líneas REH y U937 con fragmentación del DNA evaluadas mediante tinción Ioduro de propidio. a. Comparación células a diferentes h.p.i. vs no infectadas, b. Comparación del valor de cada h.p.i. vs la h.p.i. anterior	119
Anexo 6: Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus en células infectadas con rotavirus WTEW e inmunofluorescencia de cambios en el patrón de distribución de la cromatina evaluado con Ioduro de propidio a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i., a. REH, b. U937	120
Anexo 7: Tabla porcentajes de células de las líneas REH y U937 con rupturas del DNA evaluadas mediante técnica de TUNEL	122
Anexo 8: Tabla porcentajes de células de las líneas REH y U937 con rupturas del DNA y mecanismos de reparación activados evaluados mediante identificación de Poli ADP Ribosa Polimerasa (PARP)	122
Anexo 9: Tabla porcentajes de células de las líneas REH y U937 con potencial de membrana mitocondrial intacto evaluado a través de reactivo DiOC6	123
Anexo 10: Tabla porcentaje de Supervivencia en células de las líneas Reh y U937 mediante ensayo MTT. a. Comparación células a diferentes h.p.i. vs no infectadas, b. Comparación del valor de cada h.p.i. vs la h.p.i. anterior	124
Anexo 11: Tabla porcentaje de Supervivencia en células de las líneas REH y U937 mediante ensayo con Resazurina	125
Anexo 12: Tabla porcentaje de Supervivencia en células de las líneas Reh y U937 infectadas con rotavirus WTEW a diferentes MOI 10, 4 y 2 mediante ensayo con Resazurina	125

- Anexo 13:** Tabla porcentaje de células de las líneas REH y U937 positivas para ROS evaluado mediante el kit Cellomics® Oxidative Stress I 126
- Anexo 14:** Tabla porcentaje de células positivas para ROS de las líneas REH y U937 infectadas con rotavirus WTEW y tratadas con NAC o Inhibidores de la vía NFκB 126
- Anexo 15:** Tabla porcentaje de infección de antígenos virales de las líneas REH y U937 infectadas con rotavirus WTEW y tratadas con NAC o Inhibidores de la vía NFκB 127
- Anexo 16:** Tabla porcentaje de células de la línea REH infectadas con rotavirus WTEW y tratadas con NAC positivas para proteínas COX, NFκB fosforilado, IκB, PPARγ, PDI y HSP90 128
- Anexo 17:** Tabla porcentaje de células de la línea U937 infectadas con rotavirus WTEW y tratadas con NAC positivas para proteínas COX, NFκB fosforilado, IκB, PPARγ, PDI y HSP90 129
- Anexo 18:** Tabla porcentaje de células de la línea REH infectadas con rotavirus WTEW y tratadas con NAC con fragmentación nuclear evaluadas mediante tinción Ioduro de propidio, con rupturas del DNA a través de la técnica de TUNEL y mecanismos de reparación activados analizados mediante identificación de Poli ADP Ribosa Polimerasa (PARP) 130
- Anexo 19:** Tabla porcentaje de células de la línea U937 infectadas con rotavirus WTEW y tratadas con NAC con fragmentación nuclear evaluadas mediante tinción Ioduro de propidio, con rupturas del DNA a través de la técnica de TUNEL y mecanismos de reparación activados analizados mediante identificación de Poli ADP Ribosa Polimerasa (PARP) 131

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es la primera causa de muerte en países industrializados y segunda causa de muerte en países en vía de desarrollo. Se encontró que el número de pacientes con cáncer diagnosticado entre los años 2004 y 2008 fue de 28.8 millones. Se ha estimado que en el 2008 se presentaron 12,7 millones de casos de cáncer y 7,6 millones de muertes por cáncer [1, 2]. Estas cifras originan una preocupación constante por el desarrollo de nuevas estrategias para la detección temprana, clasificación de los tumores, desarrollo de terapias de prevención y tratamiento del cáncer. Los nuevos avances en tecnologías de genómica, biología molecular y conocimientos bioquímicos de la célula han permitido proponer una medicina preventiva y personalizada, un ejemplo es la evaluación de marcadores específicos los cuales pueden servir como pronóstico, diagnóstico, para predecir la farmacodinamia [9], o analizar patrones de expresión de microRNAs [10].

En la actualidad el conocimiento de vías de señalización y mecanismos por los cuales una célula normal se convierte en tumoral han llevado a proponer diferentes tratamientos que incluyen la viroterapia oncolítica. En esta estrategia, los virus pueden ser utilizados en su estado silvestre o ser modificados genéticamente, aprovechando mutaciones específicas del tumor, por ejemplo, mutaciones en moléculas que participan en el sistema de defensa antiviral, que torna a las células tumorales más susceptibles a la infección por virus. Algunos virus han sido diseñados para depender de vías de señalización o programas de transcripción que se activan en células tumorales, otros son diseñados teniendo en cuenta el proceso de entrada del virus a la célula, al modificarlos para que utilicen receptores celulares que solo se expresan en células tumorales [3]. El enfoque de especificidad de receptores ofrece seguridad en cuanto es específico de tumor, pero a la vez es una limitante porque solamente infecta los tumores que tengan dicho receptor celular. En la actualidad no se ha diseñado un virus con capacidad de actuar en los diferentes tipos de tumor o en todas las células que hacen parte de un tumor, incluso en tratamientos combinados con radioterapia y quimioterapia, debido a que los tejidos y cada una de las células tumorales presentan procesos evolutivos biológicos y bioquímicos complejos y diversos. Por otro lado según las consideraciones de la “Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)” es necesario primero caracterizar el virus oncolítico y para esto se requiere evaluar su selectividad. El análisis de la selectividad necesita de ensayos de citotoxicidad in vitro y/o replicación en líneas celulares permisivas (tumorales) y en no permisivas (células normales).

Estudios realizados en el Laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia se han generado cinco aislamientos rotavirales que infectan y lisan las líneas celulares: Sp2 Ag-14 (mieloma de ratón), U-937 (linfoma histiocítico), REH (leucemia linfocítica aguda), Kato III (carcinoma gástrico), J774 (sarcoma de células reticulares), MDA y MCF-7 (adenocarcinoma de mama), PC3 (adenocarcinoma grado IV de próstata), sugiriendo que las cepas estudiadas son potenciales virus oncolíticos, aunque no se ha profundizado en los mecanismos de muerte celular que conducen a la lisis celular. Por ésta razón,

este trabajo pretende identificar marcadores de muerte celular que produce rotavirus WTEW en líneas celulares REH y U-937 para proponer un mecanismo de muerte celular.

2. MARCO CONCEPTUAL

2.1. VIRUS ONCOLÍTICOS

Los virus son patógenos que infectan células. Utilizan su DNA o RNA para invadir la célula y usa la maquinaria de síntesis de proteína celular para replicarse y lisar la célula hospedera y propagar su progenie. La idea de utilizar virus para el tratamiento del cáncer tomo gran fuerza en los 50s y hubo un resurgimiento en su interés en las últimas dos décadas [11]. Los virus oncolíticos (VOs) son virus que infectan y se replican preferencialmente en células tumorales y las destruyen cuando finalizan sus ciclos de replicación; en cambio, las células normales no deben ser infectadas y/o su toxicidad debe ser limitada [12-14]. Cada virus tiene un tropismo celular específico que determina el tejido al cual puede infectar, por ejemplo, en el caso del virus de la rabia infecta neuronas, VIH infecta los linfocitos T ayudadores, virus de la influenza infecta el tejido de las vías respiratorias [15]. Existen algunos VOs que tienen la capacidad intrínseca de no infectar células normales pero pueden infectar y destruir células tumorales como Reovirus, virus de la enfermedad de Newcastle, Parvovirus de replicación autónoma; otros son atenuados genéticamente con mutaciones o deleciones de genes que participan en la entrada, replicación y toxicidad del virus en células normales y que no son necesarios para infección de células tumorales, como adenovirus dl1520/Onyx-015, herpes simplex virus (HSV) G207). Hay algunos modificados donde se les integraron promotores específicos de tumor que permiten limitar la expresión de genes necesarios para replicación de células tumorales, como adenovirus HSV1 que tiene el promotor del antígeno específico de próstata (PSA) restringiendo su crecimiento a tejido de próstata. Existen los que son modificados en su cubierta para tener una entrada selectiva a células tumorales y VOs que han sido atenuados por pasajes en cultivo, como en las vacunas de virus vivos [16-17] (Tabla 1).

Tabla 1: Mecanismo Anti-tumoral de virus oncolíticos

Virus	Mecanismo (s) Antitumoral
Vectores que naturalmente tienen antígenos tumorales como blanco	
Echovirus (tipo I)	La integrina $\alpha_1\beta_2$ blanco de Echovirus, es sobre expresada por células de cáncer de ovario
Coxsackievirus (A21)	DAF/molécula de adhesión intracelular 1es blanco de este virus, es sobre expresada por células de melanoma
Poliovirus	Su blanco CD155 es sobre expresado por células de glioma
Virus del Sarampión	Su blanco CD46 es sobre expresado por varias células tumorales
Vectores diseñados para unir antígenos de tumor	

Virus del Sarampión	Diseñados para unir proteína H en lugar de la proteína CD46 de activación de linfocitos (SLAM). El virus se puede propagar en células que expresan receptor de factor de crecimiento epidermal y CD38 y no se propagan en células con receptores nativos (CD46, SLAM).
Adenovirus	Los Adenovirus tipo 5 quiméricos expresan la proteína fibre-knob de otros serotipos de adenovirus (vectores Ad5/Ad3 o Ad5/Ad35) para modificar especificidad de receptor, permitiendo la unión a células tumorales en lugar de células de hígado. Un ejemplo es el receptor de Ad3 que se expresa en altos niveles en células de cáncer de ovario, por lo cual si el Ad5 expresa una proteína fibre-knob de Ad3 podría ser capaz de infectar eficientemente células de este tipo de cáncer.
Virus de estomatitis vesicular (VEV)	VEV tiene la glicoproteína de fusión sindbis-anticuerpo de cadena sencilla que se une a células de cáncer de seno a través de HER2/NEU
Vectores que tienen como blanco microambiente del tumor	
Virus del Sarampión	Tiene proteínas modificadas para que se corte y active el virus, generando capacidad infecciosa. El corte lo hacen la metaloproteínasa 2, de matriz extracelular, o la proteasa celular furin, en la proteína F viral. Estas enzimas son propias del ambientes proteolíticos, característico de tumores.
Virus de enfermedad de Newcastle NDV	Se modificó para que tenga sitios de clivaje para metaloproteínasa 2 de matriz o proteasa furin, en la proteína F viral, para ser activado solo en ambientes proteolíticos.
Reovirus	Ambiente tumoral rico en proteasa que promueve el procesamiento de reovirus y media la infectividad basada en partícula subviral.
Replicación selectiva en células tumorales	
Virus de estomatitis vesicular	Replica solo en células que son resistentes a interferon
Myxoma virus	Replica solo en células con transducción de señales activado y activador de transcripción 1 (STAT1)
Adenovirus	Replicación solo en células con promotor específico de tumor que dirige expresión de E1A (ejemplo: survivin, inhibidor de leucoproteasa secretoria o ciclooxigenasa 2)
Virus de la Influenza	Virus que tiene delecionada la proteína viral NS1. Solo se replica en células tumorales que son resistentes a interferon.
Reovirus	Replica solo en células con RAS activado
Vaccinia Virus	Replica solo en células con receptor de factor de crecimiento epidermal y E2F activados
Vectores hechos con virus que no son patogénicos para humanos	
Adenovirus	Adenovirus no seroprevalente (ejemplo: Ad11, Ad4, Ad30)
Virus de estomatitis vesicular	Serotipos Indiana y New Jersey no son patogénicos para humanos
Mixoma virus	No patogénicos para humanos
Virus de enfermedad de Newcastle	No patogénicos para humanos

Estrategias de encubrimiento para evadir respuesta inmune adaptativa	
Vaccinia Virus	Formas de virus con envoltura extracelular evaden neutralización por anticuerpos o complemento
Adenovirus	Cubierta con polietileno glicina u otros polímeros, encapsulamiento con liposomas
Inmuno supresión	
Herpes simplex virus	Co-administración de virus con ciclofosfamida para evitar inmunidad innata o adaptativa contra el virus
Reovirus	Co-administración de virus con ciclofosfamida para evitar inmunidad innata o adaptativa contra el virus

Tomado de *Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours* Kelley A. Parato, Donna Senger, Peter A. J. Forsyth & John C. Bell p965 | doi:10.1038/nrc1750

La observación de pacientes con cáncer que tenían regresión después de adquirir una infección viral hizo descubrir el potencial de los virus como tratamiento contra el cáncer (18). En 1904 se informó que una mujer de 42 años tuvo remisión de leucemia después de una infección con el virus de la influenza (19). Se comunicó que por infección concomitante con el virus del sarampión se generó la regresión espontánea de leucemia [20, 21], la enfermedad de Hodgkins [22, 23] y el linfoma de Burkitt [24]. Pacientes con diversos tipos de cáncer han sido tratados con virus, como por ejemplo en las pruebas realizadas con el virus de Hepatitis B en pacientes con enfermedad de Hodgkin (en el año de 1949); el virus Egypt 101 se ha utilizado en pacientes con cáncer que no responde a otros tratamientos (1952), el Adenovirus (APC) en carcinoma cervical (1956) y el virus del sarampión en cáncer terminales (1974) [11] entre otros, pero los efectos terapéuticos no fueron bien establecidos. Con el conocimiento adquirido en virología y biología molecular en los últimos 20 años se realizó la primera prueba con un VO recombinante [11]. Recientemente se han realizado pruebas en pacientes con melanoma maligno metastásico inyectados de manera intratumoral con el HSV que codifica para el factor estimulante de colonias granulocito - macrófago HSV-GM-CSF (OncoVEX) que llevo a una completa regresión de lesiones inyectadas y no inyectadas en 8 de 50 pacientes [25]. En otras pruebas de fase III se ha combinado VOs con drogas o radiación como el adenovirus deletado E1B-55K, H101, que se administró por inyección intratumoral a pacientes que recibían quimioterapia con cisplatino en quienes se obtuvo una tasa de respuesta del 78% comparado con los que se les administro solo quimioterapia (39%), o en pacientes con cáncer de células escamosas de cabeza y cuello o de esófago se combinó ciclofosfamida y HSV oncolítico [26]. Se han realizado además pruebas clínicas con adenovirus (ONYX-015 y CV706) [27, 28] y HSV 1 G207 y 1716 [29, 30], virus de enfermedad de Newcastle (PV701) [31], mostrando que son específicos de tumor (Tabla 2). Todos los estudios buscan determinar la selectividad oncolítica, es decir, que el virus infecte y lise las células tumorales sin afectar las normales independiente de las modificaciones realizadas con técnicas de biología molecular a las que son sometidos los virus.

Tabla 2: Pruebas de viroterapia oncolítica completados recientemente y en desarrollo.

Virus	Nombre	Modificaciones	Fase est clínico	Tumor	Ruta	Combinación
Adenovirus	Oncorine (H1O1)	E1B-55k-E3	2	“Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck” (SCCHN)	IT	Cisplatin
			3	SCCHN	IT	Cisplatin
	Onyx- 015	E1B-55k-E3B	1	Metástasis (Mets) pulmón	IV	-
			1	Glioma	Intracavitaria (IC)	-
			1	Cáncer ovario	IP	-
			1	SCCHN	IT	-
			1	Tumor solido	IV	Enbrel
			1			
			1	Sarcoma	IT	Mitomycin-C, Dox, cisplatin
			1/2	Cáncer Páncreas	IT	Gemzar
			2	CRC	IT	-
			2	Hepatobiliar	IT	-
			2	CRC, Cáncer Pancreas	IA	-
			2	SCCHN	IT	-
			2	SCCHN	IT	5-fu/ cisplatin
			2	CRC	IV	5-fu/ Leucovorin
			CG7060	PSA control	1	Cáncer próstata
	CG7870/ CV787	Ratprobasin E1A hPSA-E1AE3+	1/2	Cáncer próstata	IT	-
			1/2	Cáncer próstata	IT	Docetaxel
	CGOO70	E2F-1, GM-CSF	2/3	Cáncer de vejiga	IC	-
	Telomelysin	hTERT	1	Tumor sólido	IT	-
	Ad5-CD/TKREP	CD/TK	1	Cáncer próstata	IT	5-FC & GCV
			1	Cáncer próstata	IT	5-FC & GCV+RT
	Ad5-D24-RGD	RGD, Delta 24	1	Cáncer ovario	IP	-
			1	Glioma(MD Andersen)	IT	-
			1/2	Glioma (Erasmus Medical Center)	IT	-
	Ad5-SSTR/TK-RGD	SSTR, TK, RGD	1	Cáncer de Ovario	IP	GCV
	CGTG-102	Ad5/3, GM-CSF, Delta 24	1/2	Tumor sólido	IT	-
			1	Tumor sólido	IT/IV	Metronomic CTX
	INGN-007 (VRX-007)	wtE1a, DP	1	Tumor sólido	IT	-
ColoAd1	Ad3/11p	1/2	CRC, HCC		-	

Coxsackie virus (CVA21)	CAVATAK	-	1	Melanoma	IT	-	
			2	Melanoma	IT	-	
			1	SCCHN	IT	-	
			1	Tumores sólidos	IT	-	
Herpes simplex virus	Talimogene laherparepvec (Oncovex)	GM-CSF	1	Tumores sólidos	IT	-	
			ICP34.5	2	Melanoma	IT	-
			ICP47 (-)	3	Melanoma	IT	-
			Us11 ↑	1/2	SCCHN	IT	RT, cisplatin
	G207	ICP34.5 (-) ICP6 (-)	1/2	Glioma	IT	-	
							LacZ (+)
	G47 Delta	From G207, ICP47	1	Glioma	IT	-	
							ICP34.5 (-)
	HSV 1716 (Serprehvir)			1	SCCHN	IT	-
				1	Glioma	IT	-
				1	Melanoma	IT	-
				1	Mesotelioma	IP	-
				1	Tumores sólidos	IT	-
	HF10	Cepa HSV-1 HF		1	Cáncer páncreas	IT	-
1				Cáncer de seno	IT	-	
1				SCCHN	IT	-	
1				CRC mets hígado	IA	-	
Virus del Sarampión	MV-CEA	CEA	1	Cáncer ovario	IP	-	
			1	Glioma	IT	-	
	MV-NIS	NIS		1	Mieloma	IV	CTX
				1	Cáncer ovario	IP	-
				1	Mesotelioma	IP	-
				1	SCCHN	IT	-
Virus de la enfermedad del Newcastle	NDV-HUJ	-	1/2	Glioma	IV	-	
	PV701	-	1	Tumores sólidos	IV	-	
	MTH-68/H	-	2	Tumores sólidos	Inhalación	-	
	NV1020	'	1	Tumores sólidos	IV	-	
Parvovirus	H-1PV	-	1/2	Glioma	IT/IV	-	
Poliovirus (Sabin)	PVS-RIPO	IRES	1	Glioma	IT	-	
Reovirus (Dearing)	Reolysin	-	1/2	Glioma	IT	-	
			1	Cáncer Peritoneal	IP	-	
			1	Tumores sólidos	IV	-	
			1	Tumores sólidos	IV	CTX	
			1	CRC	IV	FOLFIRI	
			2	Sarcoma	IV	-	
			2	Melanoma	IV	-	
			2	Cáncer de Ovario, Cáncer peritoneal	IV	PTX	
			2	Cáncer páncreas	IV	PTX, CBDCA	
			2	SCCHN	IV	PTX, CBDCA	
			2	Melanoma	IV	PTX, CBDCA	
			2	Cáncer páncreas	IV	Gemzar	

			2	Cáncer de pulmón	IV	PTX, CBDCA
			3	SCCHN	IV	PTX, CBDCA
Seneca Valley Virus	NTX-010		2	Cáncer pulmón de células pequeñas	IV	-
Retrovirus	Toca 511	CD	1/2	Glioma	IT	5-FU
Vaccinia (Wyeth strain)	JX-594	GM-CSF	1	CRC	IV	-
		TK (-)	1	Tumores sólidos	IV	-
			1	HCC	IT	-
			1	Tumores sólidos pediátricos	IT	-
			1	Melanoma (Busan Corea del Sur)	IT	-
			1/2	Melanoma (Multicentro)	IT	-
			2	HCC	IT	-
			2B	HCC	IV	-
			1/2	CRC	IV/IT	Irinotecan
2	CRC	IT	-			
Vaccinia (Western Reserve)	wDD-CDSR	TK-, VGF-	1	Tumores sólidos	IV/IT	-
Vaccinia (Lister)	GL-ONC1	Renilla luciferasa	1	Tumores sólidos	IV	-
	(GLV-h68)	GFP, β -gal	1/2	Carcinomatosis peritoneal	IP	
		β -glucuronidasa	1/2	SCCHN	IV	RT, cisplatin
Virus de estomatitis vesicular (Indiana)	VSV-hIFN β	IFN β	1	HCC	IT	-

Se llevó a cabo una búsqueda en <http://www.clinicalpruebas.gov/> y en la base de datos del Journal of Gene Medicine (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>). 5-FU: 5-fluorouracil; ADP: Adenovirus death protein; β -gal: Beta galactosidase; Ca: Cáncer; CBDCA: Carboplatin; CD: Cytosine deaminase; CEA: carcinoembryonic antigen; CNS: Central nervous system; CRC: colorectal cancer; CTX: Cyclophosphamide; Dox: Doxorubicin; FOLFIRI: 5-fluorouracil, leucovorin, irinotecan; GCV: Ganciclovir; Gemzar: Gemcitabine; GFP: green fluorescent protein; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HCC: hepatocellular carcinoma; HSV: herpes simplex virus; hTERT: human telomerase reverse transcriptase; ICP: infected cell protein; IFN: interferon; IP: intraperitoneal; IRES: internal ribosomal entry site; IT: intratumoral; IV: intravenous; Mets: metastases; MV: measles virus; NDV: Newcastle disease virus; NIS: sodium iodide symporter; PanCa: cancer pancreatico; PSA: prostate specific antigen; PTX: paclitaxel; RT: radiation; SCCHN: squamous cell carcinoma of the head and neck; Somatostatin R: somatostatin receptor; SSTR: somatostatin receptor; TK: thymidine kinase; VGF: vaccinia growth factor; Wt: wild-type.

Tomado de Russell, S.J., K.W. Peng, and J.C. Bell, *Oncolytic virotherapy*. Nat Biotechnol, 2012. **30**(7): p 658-70.

Existen diferentes virus que han sido modificados en los laboratorios dentro de los que se encuentran:

Adenovirus

El Onyx- 015 se manipuló para retirar el producto del gen viral E1B-55K, requerido para degradación de la proteína celular p53 [3, 32]. Este virus tiene selectividad por células tumorales carentes de la proteína p53 y las destruye por lisis, produciendo propagación de su progenie al resto de la masa tumoral al infectar células cancerosas vecinas, perpetuando ciclos de infección viral, replicación y oncólisis [33, 34]. Se encuentran publicadas 18 ensayos clínicos con este VO [35]. En el 2001 se generó el primer informe de administración intra-vascular con este virus modificado genéticamente. Un ensayo clínico de fase 1 se hizo en pacientes con carcinoma gastrointestinal predominantemente. Se infundió en la arteria hepática en dos ciclos (1 y 8 días). En los ciclos posteriores se suministró con quimioterapia intravenosa. No hubo toxicidad con las dosis suministradas. Los títulos de anticuerpos aumentaron en todos los pacientes y se detectó la replicación viral al aplicar dosis altas en pacientes. Como consecuencia en la actualidad se estudia en combinación con quimioterapia [36].

Herpes simplex virus 1 (HSV1)

HSV1 es un virus envuelto de DNA lineal de doble cadena, su genoma es de 152kb que codifica para 80 genes. Su genoma está compuesto de un segmento largo y uno corto que son flanqueados por repeticiones invertidas. Su infección puede ser lítica y se han clasificado en tres subfamilias: alpha, beta y gamma herpesvirinae. Dentro de la célula infectada, la RNA polimerasa celular tipo II puede producir hasta 50 tipos diferentes de mRNA que están organizados en 3 bloques: Inmediatamente tempranos (alfa) que regulan la transcripción, tempranos (beta) promueven la síntesis viral de DNA y tardíos (gamma) que permiten la síntesis de proteínas, el encapsulamiento de DNA y envoltura viral [35]. Este virus es neurotrópico.

Se han realizado varios estudios con HSV manipulados por biología molecular para aumentar la especificidad. En 1991 se utilizó un HSV atenuado de replicación competente para el tratamiento de glioma [3], usando un promotor de albumina para las células de hepatoma (1997) [36]; con el fin de aumentar su potencia se utilizó una HSV-thymidine kinase para utilizarlo en combinación con quimioterapia (1998) [15]; para estimular el sistema inmune se utilizó HSV que codifica para la IL-12 y el GM-CSF para reclutamiento de linfocitos T, aumentando la respuesta inmune anti-cáncer (2001) [38]. El primer informe en que se utilizó HSV inyectado intratumoralmente fue en una prueba de II fase (OncoVEX) en pacientes con melanoma en el cual se obtuvo 26% de respuesta completa con durabilidad en lesiones inyectadas y no inyectadas. OncoVEX en la actualidad se encuentra en prueba fase III [15, 25].

Vaccinia

Es un poxvirus con un DNA de genoma lineal de doble cadena, envuelto, altamente inmunogénico en humanos, se replica en citoplasma, no se integra al cromosoma y es lítico. El genoma puede transportar DNA recombinante, anteriormente fue utilizado como una vacuna para erradicar la viruela. Se realizó un estudio fase I con la administración intravesical a pacientes con carcinoma de

células transicional invasiva de músculo antes de la cistectomía radical. Infectó efectivamente mucosa de la vejiga y tumor, con toxicidad aceptable, con reclutamiento de linfocitos e inducción de una respuesta inflamatoria local [39]. En 2008 se utilizó en pacientes con tumor en el hígado, en una prueba fase I utilizando el vaccinia JX-594, modificado por inserción de FSC-GM y gen *LacZ*. Se administró por inyección intratumoral en tumor primario o metastásico en hígado y fue bien tolerado. La dosis de toxicidad limitante se evaluó por bilirrubinemia y fue aceptable teniendo en cuenta la replicación, expresión de FSC-GM y propagación sistémica. Este virus tiene un efecto antitumoral contra varios carcinomas refractarios [40].

Virus del sarampión

Es un virus de RNA de cadena negativa, hace parte de la familia *Paramyxoviridae*. Las células tumorales que son infectadas expresan las proteínas fusogénicas virales, lo que genera fusión con células circundantes no infectadas formando sincitios y produciendo muerte celular apoptótica [41]. En 2005 el virus de sarampión atenuado se administró intratumoralmente en ratón que albergaba un xenoinjerto de tumor humano positivo para EGFR y CD38 y demostró actividad antitumoral mediada por su receptor específico [42]. En una prueba fase I se administró intraperitonealmente el virus del sarampión modificado, observando su efecto mediante la medición del antígeno carcinoembriónico en pacientes con cáncer de ovario. Se observó que el virus infecta pocas células tumorales y no fue sustancialmente amplificado in vivo [41].

Virus de la enfermedad de Newcastle

NDV es un virus aviar que hace parte de la familia *Paramyxoviridae* virus de RNA de cadena negativa, no segmentado y envuelto. No es patogénico en humanos [35]. En una prueba fase I/II se aplicó NDV HUIJ lentogénico, que produce fuertes señales del sistema inmune innato produciendo apoptosis. NDV HUIJ se administró en pacientes con glioblastoma multiforme recurrente por infusión intravenosa encontrando que es bien tolerado y la toxicidad es mínima. La dosis máxima tolerada no fue alcanzada, el virus se recuperó en saliva, sangre, orina y biopsia del tumor [43]. En otra prueba se informó que utilizando 2 pasos de desensibilización provee tolerabilidad al reducir frecuencia y severidad de síntomas con respecto a otros regímenes utilizados anteriormente [44]. Para esto, se administró a los pacientes con tumores sólidos una primera dosis de NDV PV701, y luego las dosis subsecuentes fueron reducidas; de esta manera se produjo actividad antitumoral.

Reovirus

Es un miembro de la familia *reoviridae* que incluye seis géneros *Orthoreovirus*, *Colitivirus*, *Orbivirus*, *Fijivirus*, *Cypovirus* y *Rotavirus*. Es un virus de RNA no envuelto, del género *Orthoreoviridae*, que son virus con genoma de doble cadena de RNA dividido en 10 segmentos de tres tamaños denominados L, M y S [35, 45]. En 1970 se iniciaron estudios de su capacidad oncolítica al observar que reovirus wt se replicaba en las células tumorales [46], pero no en células normales. Se encontró que células con el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) en altos niveles y células con el receptor mutante truncado, fueron susceptibles a la infección por reovirus [47]. Esto permitió sugerir que la replicación viral era gracias a un factor intracelular

relacionado con el receptor, sin relacionar al receptor en sí [48]. Luego, se identificó corriente abajo del receptor EGF la vía Ras y se observó su importancia para la infección por el reovirus [45]. Recientemente se han realizado diferentes estudios con este virus uno de ellos se realizó en 2008, en el que se utilizó Reovirus tipo 3 Dearing (Reolysin; Oncolytics Biotech), por administración intravenosa en pacientes con cáncer avanzado, encontrándose que fue seguro y bien tolerado, no se alcanzó la dosis de toxicidad limitante. Las biopsias pos-tratamiento indican que hubo propagación del virus al tumor después de la administración intravenosa. Aunque se evidencio que pueden existir obstáculos para uso clínico por neutralización del virus con títulos de anticuerpos antireoviral [49]. También en 2008 se informó del primer estudio de un virus vivo, con replicación competente y sin modificaciones genéticas, administrado intra-cerebralmente de manera directa en tumores de cerebro de pacientes. En esta prueba fase I, de pacientes con confirmación histopatológica de gliomas malignos recurrentes, se encontró que el virus intratumoral fue bien tolerado y seguro a dosis y esquemas usados, no se evidencio encefalitis viral, pero se requieren de estudios adicionales para evaluar ruta de administración y su eficacia [50].

2.1.2. CONSIDERACIONES PARA EL DESARROLLO CLÍNICO DE VIRUS ONCOLITICOS

Las autoridades regulatorias representadas por el ICH acuerdan que el potencial terapéutico de VO se debe equilibrar con los riesgos asociados con el uso de virus que es de replicación competente.

Los principios generales para el desarrollo clínico de VO se deben aplicar en cada región. Es necesario realizar ensayos *in vitro* en líneas de células tumorales (permisivas) y en células normales (no permisivas) para evaluar la citotoxicidad, lisis y/o replicación para poder demostrar la selectividad en células tumorales antes de iniciar estudios clínicos en pacientes.

Se debe tener en cuenta que la **selectividad** no es una medida de potencia de la actividad antitumoral de los virus oncolíticos. Se deben hacer ensayos en los que se evalué la propagación viral y hacer relación con la actividad biológica en células tumorales.

Un VO puede presentar **variantes moleculares** que deben ser caracterizadas teniendo en cuenta las modificaciones en su selectividad de replicación o en su perfil oncolítico. Se debe evidenciar la cantidad de variantes y su naturaleza, determinar la estrategia para su selección al igual que su estabilidad genética. Antes de iniciar con estudios no clínicos, es necesario tener en cuenta qué resultados se han obtenido con VO similares. Estos estudios se deben llevar a cabo con los constructos con que se van a hacer los pruebas clínicas.

Para **seleccionar un modelo animal** se deben tener en cuenta tropismo viral, infectividad, habilidad de replicación, potencial citopático y efecto antitumoral del VO. Tanto las especies animales que no desarrollan tumor, como las que albergan tumores xenotransplantados o los animales singénicos son útiles para los estudios no clínicos a pesar de factores limitantes como susceptibilidad a la infección y replicación viral o inhabilidad del modelo para los aspectos relacionados con el sistema inmune.

El potencial del mecanismo de acción, la bioactividad y el perfil farmacológico del VO (**POC**), se entiende como el potencial de inducir el efecto biológico deseado. Todo esto permite definir en qué población se va a administrar el VO, y su factibilidad de uso en un cáncer específico, teniendo en cuenta la replicación y su respectiva actividad antitumoral. Estos estudios en animales además son importantes para: 1. Definir cuál es el rango de dosis activa farmacológicamente 2. Definir cuál es la ruta de administración óptima para cada VO 3. Definir un esquema para administración de dosis en fase temprana de pruebas clínicas.

Los **estudios de biodistribución** se relacionan con la evaluación de todos los órganos, tanto de los órganos con tumores como los no tumorales, para evaluar diseminación del VO. Se pueden realizar ensayos sensibles, como los análisis de secuencias de ácidos nucleicos o la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. Esto permite evaluar el potencial de infección del VO, en tejido tumoral y en tejido normal, porque en este último el VO puede tener replicación competente. En caso de encontrarse cantidades significativas de genoma viral en tejido no tumoral, se podría requerir estudio de fluidos biológicos y tejidos a través de patología e histopatología, que ayudarían a evaluar toxicidad, al correlacionar presencia de genes virales con señales adversas en el animal.

La **excreción viral** se define como la propagación del VO en las excreciones y secreciones del VO de los pacientes. Esto debe evaluarse y es de gran interés porque debido a un mal manejo terapéutico podría darse una transmisión del vector persona – persona. La evaluación de la excreción del VO permite evaluar el potencial del VO para infectar a otros. El estudio en animales sobre la excreción del virus, permite obtener información de cómo podría ser el procedimiento de monitoreo clínico y monitoreo de efectos adversos a largo tiempo en estudios clínicos y no-clínicos.

La duración de los **estudios de toxicología** y selección de tiempo de sacrificio de los animales se guían de acuerdo al perfil de expresión del transgen (si está) y la biodistribución del virus oncolítico. El estudio debe permitir evaluar la identificación, caracterización y cuantificación potencial de producir toxicidad sistémica y local después de su administración. El estudio de toxicología en animales puede ser diseñado teniendo como guía la vía y procedimiento de administración, el intervalo de dosis potencial terapéutica y horarios de dosis, información que permite guiar su uso en ensayos clínicos. Debido a lo anterior es necesario que los estudios toxicológicos midan y evalúen la toxicidad aguda y crónica, si es reversible o no, si existe toxicidad tardía y efectos dosis-respuesta. Además el estudio toxicológico debe expresar características del virus, su potencial de replicación e infectividad en células y tejido normal y en respuesta no inmune al VO.

En **estudios clínicos** tempranos deben aclarar preguntas que permanecen desde los estudios con animales, los cuales no proveen información adecuada y segura, como los regímenes de dosis y rutas de administración. Una estrategia utilizada para evaluar los rangos de dosis y vía de administración en prueba ha sido seguir una serie de pasos, primero probando la administración

por inyección intratumoral, luego regional o local y finalmente administración sistémica. Se debe justificar la ruta de administración seleccionada y el potencial de replicación en tejidos no tumorales del VO. En caso de no estar disponible se debe tener en cuenta terapia antiviral para evitar replicación del VO.

Para evaluar la **farmacocinética, farmacodinámica y actividad biológica**, se debe monitorear la propagación de VO por ensayos de PCR y de infectividad los cuales se deben realizar de manera periódica con suficiente frecuencia y duración para detectar picos de virus en sangre después de la administración del vector. Lo anterior podría dar información acerca de la replicación viral en tejidos permisivos. Otros estudios que se pueden realizar es el monitoreo de un marcador viral o expresión de un transgen. Además se puede considerar el estudio de biopsias o resecciones de tumor para evaluar la patología del tumor.

Respecto a la **bioseguridad**, se deben tener todas las precauciones para manejo de material infeccioso y biológico cuando es administrado el VO. Se deben seguir regulaciones del país, del departamento, local e institucional. Como parte del protocolo clínico, todas las autoridades regulatorias requieren alguna forma de barrera de protección para duración de la prueba clínica como precaución estándar. La preparación de los estudios clínicos y métodos de detección pueden tener en cuenta los estudios no clínicos previos sobre la excreción del virus. En el plan de desarrollo clínico, puede ser útil monitorear la propagación del virus y tomar precauciones para minimizar el contacto del personal de asistencia médica, familia y otros pacientes, teniendo especial cuidado con pacientes inmunosuprimidos e inmunocomprometidos y población relevante. Podría ser adecuado instruir al paciente y a la familia sobre cómo reducir el riesgo de transmisión persona – persona después de la administración ambulatorio del VO y en la vida diaria. Además se puede incluir asesorías de medidas sanitarias específicas.

2.2. ROTAVIRUS

Rotavirus hace parte de la familia *Reoviridae*, presenta una simetría icosaédrica, con un diámetro promedio de 75 nm y no posee envoltura lipídica. Es un virus de RNA de doble cadena dividido en 11 segmentos que se encuentran rodeados por tres capas concéntricas de naturaleza proteica en las cuales están ubicadas las proteínas estructurales. La partícula viral completa es conocida como triple capa proteica (TLP)[51]. Las proteínas estructurales se encuentran distribuidas así: la capa externa está conformada por las proteínas VP7 y VP4. Hay siete copias de la proteína VP7 que son agrupados en 260 trímeros. La VP4 se encuentra como dímero formando 60 espículas sobre la capa externa [52]. Estas proteínas VP4 y VP7 permiten clasificar a rotavirus en tipo G y tipo P [51]. La capa media está conformada por la proteína VP6, las partículas que en su exterior tienen VP6 se conocen como doble capa proteica (DLPs). La VP6 mantiene la misma simetría que la proteína VP7, VP6 tiene 780 copias conformadas en 260 trímeros y están ubicados alrededor de la VP7. La capa interna está conformada por la proteína VP2, en este punto es reconocida como capa

proteica simple (SLP) que alberga el RNA genómico cubierta por una capa compuesta de 120 copias de VP2 [52]. Además posee seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6).

Los rotavirus infectan células epiteliales del intestino delgado, en donde se replican y producen citolisis. Los rotavirus se pueden clasificar según las propiedades antigénicas de la VP6 en cinco grupos serológicos desde la A hasta la E según el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (197). Además se pueden clasificar porque las proteínas VP7 y VP4 inducen anticuerpos neutralizantes. Con estas dos proteínas se ha realizado un sistema de clasificación de rotavirus en tipo G (exclusivo de VP7, G por glicoproteína) hay al menos 16 diferentes tipos, en tipo P (exclusiva de VP7, P por proteína sensible a proteasa) de los cuales se conocen 27. De este número de tipos 11 de tipo G y 11 de tipo P infectan humanos [52].

Figura 1: Estructura de rotavirus a través de microscopía electrónica.

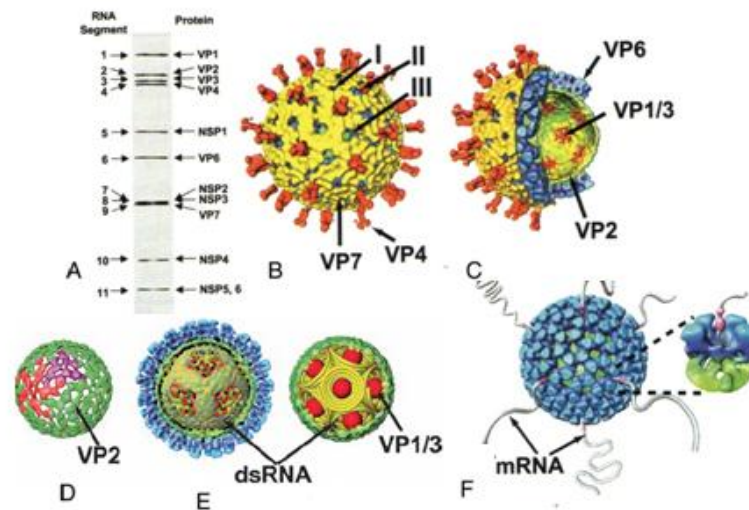


Figura 1. Organización estructural de rotavirus: **(A)** Gel de poliacrilamida mostrando 11 segmentos de RNA de doble cadena, cada uno corresponde a un gen al cual se le asigna una proteína. **(B)** Se muestra la estructura de una partícula de TLP. Se muestran los canales clase I localizados en los bordes de los 5 ejes de simetría, canales II ubicados en cada uno de los lugares pentavalentes alrededor de canales tipo I y canales tipo III que están localizados en las posiciones hexavalentes de la cápside que rodea tres ejes. Proteína VP4 de color rojo y capa proteica de VP7 en amarillo. **(C)** Un corte de estructura de rotavirus (TLP) permite observar proteínas de capas internas. VP6 azul, VP2 en verde, VP1 y VP3 en rojo. Hay 12 copias de complejos VP1/VP3 unidos a la parte interna de VP2 **(D)** Organización estructural de la capa de VP2, los dímeros se observan en rojo y morado. En verde se observa genoma rotaviral alrededor de enzimas. **(E)** La capa de VP6 y VP2 que hacen parte de la DLP exponiendo el RNA. La capa de RNA tiene una apariencia dodecaedral, y está alrededor de los complejos de transcripción por formados por VP1 /VP3 en los cinco vértices **(F)** DLPs en proceso de transcripción con liberación de transcritos de RNA (gris) a través de canales clase 1 localizados en los bordes de los 5 ejes de simetría. [51]

2.2.1. Epidemiología

La diarrea aguda infecciosa viral puede ser causada por virus como norovirus, adenovirus, calicivirus, astrovirus y rotavirus. Rotavirus puede causar un cuadro clínico que va desde diarrea leve y acuosa de duración limitada hasta una diarrea severa con vómitos y fiebre que, puede desencadenar una deshidratación y shock, alteraciones electrolíticas y muerte [53]. Comienza con la aparición de vómito y fiebre (39°C), seguidos de 24 a 48 deposiciones acuosas y frecuentes [54]. En niños menores de cinco años la principal causa de gastroenteritis es rotavirus alrededor de todo el mundo. Debido a la morbilidad generada por este virus, se han desarrollado vacunas contra rotavirus [55]. En estudio realizados con datos entre años 1986 a 1999 aproximadamente el 22% de hospitalizaciones de niños por diarrea se deben a rotavirus, y causa aproximadamente 440.000 muertes de niños menores a 5 años de edad en todo el mundo, mientras la Organización Mundial de la Salud da un estimado de 611.000 (en un rango 454.000 – 705.000) [56]. En estudios más recientes se encuentra que hospitalizaciones debido a rotavirus aumentaron, se puede sugerir que se debe a mejoras sanitarias y en higiene lo que permite un gran impacto en la disminución de hospitalizaciones debidas a bacterias y parásitos [56].

Rotavirus se transmite principalmente por ruta oral-fecal, por contacto persona – persona o por fómites, a través de agua o comida contaminada es rara pero posible [57]. Rotavirus es muy resistente a las condiciones ambientales. Heces de niños con diarrea aguda producida por este patógeno tienen un alto número de partículas virales y debido a la pequeña dosis del virus que causa diarrea permite una amplia y efectiva propagación a hospederos susceptibles ($DL_{50} = 10$ unidades formadoras de placa (pfu)) [57].

2.2.2. Proteínas estructurales y su participación en la conformación del virión de Rotavirus

La partícula de triple capa (TLP) está conformada 3 capas concéntricas. La capa más interna (core Shell) se encuentra conformada por 120 copias de la proteína VP2 (102 kDa) [58], la VP2 está en dímeros, cada monómero en cada dímero posee una conformación diferente. Una conformación de VP2 A confluye alrededor de los 5 vértices, donde otro dímero de VP2 B que se encuentra más atrás, se intercala. Los residuos del extremo amino terminal de VP2, es una región flexible que se proyecta hacia los cinco vértices, que le permite unirse al complejo de la polimerasa viral (conformado por una copia de una RNA polimerasa dependiente de RNA conocida como VP1 (125 kDa) y enzima RNA- capping o VP3 (88 kDa), responsable de modificación en extremo 5' para generar el CAP) [58].

La capa intermedia está compuesta por la proteína VP6 (monómero de 45 kDa) y cuando la partícula viral tiene expuesta esta proteína se conoce como doble capa proteica (DLPs). La simetría de VP2 resulta en cinco distintas posiciones de la VP6 que conforma la capa intermedia [59]. La VP6 tiene dos dominios, el dominio B y el dominio H, ambos participan en la estabilización de los

260 trímeros formados por la VP6 [60]. Tiene un papel clave en la arquitectura de rotavirus porque se une a la VP2 de la capa interna a través de su dominio bajo B formado por un clúster de hélices alfa y a las proteínas VP4 y VP7 de la capa externa por medio de un dominio H distal de hojas beta antiparalelas. Esto le permite tener dos funciones principales participar en la entrada del virus a la célula (capa externa) y en la transcripción endógena (capa interna) [52].

La capa externa se encuentra integrada por las proteínas VP4 y VP7, la proteína VP7 (cada monómero 37 kDa) forma 260 trímeros que se ubican directamente encima de los trímeros de la VP6 lo que permite la formación de perforaciones en ambas capas intermedia y externa. Las extensiones en su N-terminal permiten unirse a la VP6, además permite unirse a otras moléculas de VP7 y a trímeros de VP7 dando estabilidad a la capa externa [61, 62]. La VP4 (88 kDa) se encuentra en la capa externa en dímeros que forman 60 espículas que se extienden desde la superficie del virus. La proteína VP4 participa en el proceso de anclaje y la penetración del virus a la célula, como también en los procesos de neutralización, hemaglutinación, virulencia y aumento de la infectividad de rotavirus [63]. Se ha informado que el clivaje proteolítico de la VP4 genera una mayor eficiencia en la entrada a la célula [64]. Este proceso proteolítico de VP4 (88 kDa) lo cliva en dos fragmentos de menor peso molecular, el extremo N-terminal o VP8 (28 kDa) y fragmento C-terminal o VP5 (60 kDa), que persisten asociados en el virus [65, 66]. La VP8 está relacionado con unión a ácido siálico, y se conoce como la hemaglutinina viral, mientras la VP5 interactúa con integrinas [67]. Este clivaje de VP4 puede ser inducido por proteasas tales como la tripsina del tracto gastrointestinal del hospedero [68]. La VP4 se le puede inducir cambios conformacionales con tripsina y esto permite que se presente una mayor infectividad de rotavirus [66].

2.2.3. Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales NSP1 a NSP6 son codificadas por los genes virales 5, 7, 8, 10 y 11 respectivamente. Estas proteínas se asocian a intermediarios de replicación por lo cual se pueden asociar con eventos tempranos en el ciclo replicativo de rotavirus, en los procesos de maduración de partícula viral, empaquetamiento de genes virales, y están relacionadas con síntesis de proteínas virales y celulares.

NSP1 es una proteína básica de unión al RNA de 55 kDa que se acumula en el citoplasma de células infectadas. Actúa como un modulador de la respuesta inmune al interactuar con IRF3 (factor regulador de interferón 3) induciendo su degradación. Lo que permite que sea antagonista de la vía de señalización del interferón [69]. Además de IRF3 también se ha reportado la degradación por parte de la NSP1 de los factores reguladores de interferón IRF5 y 7 [70]. La NSP1 se une al citoesqueleto y posee en su amino terminal una región rica en cisteína que participa en unión al extremo 5' de RNA de cadena sencilla, actividad específica para RNAm de rotavirus, se ha propuesto que la NSP1 podría participar en el bloqueo de la traducción del RNAm virales, conduciéndolo a servir como templado para la síntesis de RNA de doble cadena virales en el viroplasma [71-73].

NSP2 (35 kDa) es una proteína básica, forma multímeros que han sido asociados con la VP1 y la NSP5, se ha encontrado que se acumula en viroplasma. Está asociada con la actividad nucleósido trifosfatasa (NTPasa), en presencia de Mg^{2+} hidroliza los NTPs en NDPs, lo que resulta en fosforilación de la NSP2. El empaquetamiento del RNAm viral requiere de energía que podría ser dada por la actividad NTPasa de la NSP2 [74].

NSP3, es una proteína ácida, está distribuida en el citoplasma y puede interactuar con el citoesqueleto. Se asocia con secuencias consenso (UGACC) en su extremo 3' del RNAm viral conservado en todos los RNAm de rotavirus. La NSP3 también se ha demostrado que interactúa

Figura 2: Ubicación de las proteínas estructurales en la partícula viral

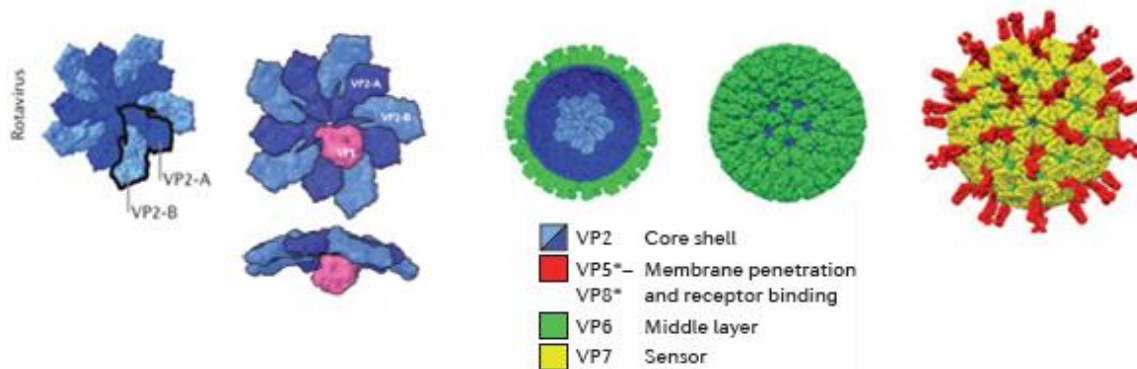


Figura 2. El rotavirus DLP (Protein Data Bank (PDB) ID [3KZ4](#)), es mostrado en 3 y 4 imagen, es la partícula viral activa transcripcionalmente. La primera imagen representa el decámero formado por la capa interna de cápside, proteína VP2; las subunidades VP2-A y VP2-B del decámero simétrico cinco, muestra el rearrreglo de la cápside. Subrayado con negro unidad asimétrica $T=1$ formada por un VP2-A y un VP2-B. Evidencia estructural sugiere que VP1 está en posiciones específicas en el core cerca a los cinco vértices, como se muestra en la segunda imagen. Es probable que un solo VP1 este unido a cada decámero. VP3 posiblemente este próximo a VP1 pero no ha sido observado. En cuarta imagen se observa una capa continua que estabiliza la capa interna de la cápside con proteínas de capa externa. La vista final representa el virión infeccioso de rotavirus (PDB IDs [3IYU](#) and [3N09](#)) está recubierto con proteína trimérica VP7, decorada con complejos de espículas de VP5 – VP8, los cuales median anclaje y entrada. Grafica adaptada de *Rotavirus Proteins: Structure and Assembly*. J. B. Pesavento [52]

con su extremo C-terminal con el factor de iniciación de traducción 4GI (eIF-4GI) evitando que la proteína de unión a poli (A) se una a la maquinaria de traducción, inhibiendo así la traducción del huésped [75]. Asociada con la NSP1 permite el transporte de RNAm del virus al viroplasma para su subsecuente replicación [52, 76].

NSP4 (20 kDa) es una proteína residente de retículo endoplásmico, ubicada cerca al viroplasma, es una proteína integral de membrana, reguladora del ensamble de la capa externa del virión. Los 175 aa de su N- terminal le sirven de anclaje en el retículo endoplásmico (RE), el C terminal

hidrofílico se encuentra ubicado hacia el citoplasma. Los últimos 17 a 20 aa (156 a 175) del C-terminal de NSP4 actúan como un receptor para las partículas de doble capa viral (a través de VP6) mediando su entrada en el lumen RE, una vez llegan a él RE adquieren las proteínas VP7 y VP4 de la capa externa [77, 78].

NSP5 es una fosfoproteína dimérica rica en residuos de serina y treonina, posee actividad autoquinasa. Posee diferentes formas moleculares desde 26 a 35 kDa dependiendo del sitio en que este fosforilada. Interactúa con otras moléculas de NSP5, NSP2, NSP6 y con el RNA. Participa en la formación del viroplasma, la replicación del genoma y en el empaquetamiento de la partícula viral [52, 59]. Se ha sugerido que la NSP5 interactúa con la VP2 y que esta unión compite con la unión de VP2 con VP6 de la capa intermedia, así bloqueando el ensamble de la capa externa y permitiendo que estas partículas se sigan replicando [79].

2.2.4. Entrada del virus a la célula

Rotavirus *in vivo* tiene tropismo por los enterocitos maduros, que no están en división de vellosidades de intestino delgado, sugiriendo que estos enterocitos expresan moléculas que le permiten la entrada y replicación de rotavirus en la célula, tales como receptores. En diferentes estudios en modelos en niños y animales se ha encontrado a rotavirus en tejidos extraintestinales (bazo, corazón, pulmón, riñón, testículos, vejiga, glándula suprarrenal, y el páncreas) altamente vasculares, lo que ha permitido sugerir que la presencia del virus en estos tejidos es debido a la viremia, mas no se ha hallado evidencia de replicación en estos sitios [80, 81]. También se sabe que rotavirus puede infectar células de origen intestinal (Caco-2, HT-29, T-84, HCT-8, LoVo, Int 407 y AGS), renal (MA104, BSC-1, BGM y MDCK-1) y líneas de células transformadas de mama (UACC-903), estomago, hueso (HOS-TK y TE85) o pulmón. Se encontró que líneas celulares que no eran susceptibles de infección por rotavirus después del proceso de lipofección de DLPs competentes transcripcionalmente permitían la eficiente replicación viral, por lo cual se podría sugerir que los receptores permiten la susceptibilidad o no [82].

Rotavirus entra a la célula hospedera a través de diferentes moléculas y pasos, requiere de la unión a receptores que le permite anclarse y de receptores que permitan su internalización, los cuales podrían necesitar de un orden específico, que permitiría explicar porque rotavirus tiene un tropismo celular y de tejido selectivo [81].

El ácido N-acetil neuraminico conocido como ácido siálico (AS) es requerido por algunas cepas de rotavirus animal para unirse y entrar a la célula, se observa que cuando son tratadas con neuraminidasa disminuye la infectividad de rotavirus, mientras que una vasta mayoría de cepas de origen humano no son sensibles al tratamiento, por lo cual no necesitan de AS para entrar a la célula [83]. En células en cultivo pueden no ser esencial la unión a este azúcar, pero puede que en los enterocitos si sea necesario unirse a este tipo de azúcares para poder infectar [81]. El AS se ha informado que se puede unir al fragmento VP8 (entre los aa 93 y 208) de la proteína VP4 viral en cepas sensibles a neuraminidasa [65]. Es posible que tanto cepas de rotavirus que se unen al AS

como las que no también se unan a un segundo receptor celular, posiblemente a las integrinas [84].

Se ha informado recientemente que la proteína VP4 de rotavirus se puede unir a las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ a través de motivos de secuencia tripéptido y la VP7 tiene sitios de unión a integrinas $\alpha \beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$. Anticuerpos dirigidos contra estas integrinas o péptidos que simulan los sitios de unión a ligandos bloquean la entrada de rotavirus a la célula tanto de cepas dependientes o no dependientes de AS para su entrada, lo que puede indicar que las integrinas participan en la entrada de rotavirus a la célula [85]. La proteína VP4 viral se ha encontrado que puede unirse a la integrina $\alpha \beta 3$ en ausencia del motivo RGD presente en ligandos de esta integrina. La interacción del virus con la integrina se ha relacionado con la presencia de la VP7 [84].

Se sabe que la proteína de choque térmico Hsc70 podría estar involucrada como receptor post-unión en cepas de rotavirus sensibles o no sensibles a neuraminidasa [86]. Se ha reportado que dominios de la proteína VP6 durante la infección por rotavirus se une con la Hsc70 y durante el proceso de entrada de rotavirus a la célula. Esto se determinó realizando ensayos de inhibición utilizando DLPs y péptidos sintéticos de proteínas virales VP4 y VP6 individualmente o en combinación, los cuales inhibieron la entrada de rotavirus RRV, YM y WA a las células MA104 y Caco 2 de una manera dosis dependiente [87]. También se encuentran evidencias de la interacción entre proteína VP5 de rotavirus y Hsc70 de superficie celular en un paso post anclaje [88]. Igualmente que Hsc70 y la integrina $\beta 3$ se encuentran formando un complejo en los rafts lipídicos de las células MA104 y Hsc70 se sobre-expresa intracelularmente y en membrana citoplasmática luego de infectar con rotavirus las células MA104 [89].

Estudios en células MA104 han mostrado inhibición de la infectividad por rotavirus al utilizar inhibidores de intercambio tiol/ disulfuro, impermeables a membranas, como Bacitracina y DTNB o utilizando anticuerpos contra proteína disulfuro isomerasa (PDI), lo cual llevó a proponer que el proceso de intercambio tiol / disulfuro está relacionado con la entrada del virus a la célula y que PDI de superficie celular es un blanco potencial de inhibición de la infectividad por estos inhibidores. Se reportó además que PDI está ubicada en los rafts lipídicos de igual manera que Hsc70 y la integrina $\beta 3$ y estas tres proteínas están asociadas a través de uniones peptídicas [90]. Estudios en vellosidades de ratón infectadas con rotavirus ECwt demuestran que proteínas PDI, Hsc70 e integrina $\alpha \beta 3$ asociadas a rafts lipídicos participan en el proceso de entrada de rotavirus tal como ocurre en las células MA104 [91].

2.2.5. Ciclo replicativo

El rotavirus inicialmente se une a los receptores de la célula hospedera a través de las proteínas VP4 y VP7 presentes en la partícula de triple capa proteica TLP, lo que permite el anclaje y posterior entrada vía endocitosis del virus a la célula. Bajos niveles de Ca^{++} del endosoma provocan el desensamble de la VP7 de la capa externa de la partícula viral [92, 93]. Sin la VP7, la VP4 sufre cambios producidos por proteólisis, exponiendo su extremo C-terminal (VP5) que le permite penetrar la membrana endosomal y la liberación de la partícula de doble capa proteica (DLP) que es activa transcripcionalmente en el citosol [59].

Una vez la DLP entra al citoplasma activa el complejo polimerasa interno del virus (VP1 y VP3) para transcribir el RNA de sentido positivo no poliadenilados de cada una de los 11 segmentos de RNA doble del genoma viral. Los RNAs positivos sirven de molde para la traducción de las proteínas virales en los ribosomas celulares y como síntesis para el RNA de sentido negativo durante replicación del genoma, una vez se forma el RNA genómico sale de la DLP por canales ubicados en cinco vértices y es adicionado el cap por la VP3. Todos estos componentes RNAs y proteínas se acumulan en inclusiones intracitoplasmáticas denominadas viroplasma formadas por proteínas NSP5 y NSP2 principalmente [51, 59].

Los viroplasmas contienen todas las proteínas virales necesarias para la replicación del genoma de rotavirus y el ensamble de viriones. La VP1 (se cree que con VP3) se une al extremo 3' de RNA positivo viral obteniendo complejos RNA+-enzima provocando la producción de genoma segmentado. Luego se ensambla la VP2 al complejo activando la VP1, enzima RNA polimerasa dependiente de RNA para producir el RNA sentido negativo y generar el RNA de doble cadena. Finalmente se incorpora la proteína VP6 quedando conformada la DLP [51, 59].

Una vez está formada la DLP sale del viroplasma a través de la proteína VP6 que se une a extremo C-terminal de NSP4 proteína residente del RE, entra en el RE y adquiere en su estructura las proteínas VP4 y VP7 de la capa externa convirtiéndose en TLP. Estudios han evidenciado que la VP4 podría integrarse al virión en estructuras como rafts cercanas a la membrana plasmática, formando partículas virales maduras que son liberadas por lisis en células no polarizadas o por salida sin efecto citopático evidente en células polarizadas [51, 59].

2.2.6. Rotavirus y muerte celular

La infección por rotavirus ha sido asociada con alteraciones celulares que promueven la lisis celular tanto *in vivo* como *in vitro*. La forma en la que contribuyen los procesos de muerte celular por apoptosis y necrosis en células infectadas por rotavirus aún se encuentran en estudio. En 1996 fueron descritos los efectos producidos por la sepa de rotavirus de simio SA11 en la línea celular HT29 de adenocarcinoma colorectal de humano que incluían cambios en la membrana plasmática, condensación periférica de la cromatina y fragmentación nuclear, que permitió sugerir que la apoptosis podría estar involucrada en el proceso de la infección por rotavirus y en la enfermedad diarreica inducida por rotavirus [94].

En la línea celular epitelial de riñón de mono MA104 infectadas con rotavirus SA11 o rotavirus porcino 1154 se encontraron cambios ultraestructurales asociados con muerte celular por apoptosis, aunque al evaluar rupturas del DNA por medio del método de *In situ* "terminal deoxynucleotidyl transferase (Tunel) assay" no produjo resultado positivo por lo que concluyeron que rotavirus produce su mayor efecto degenerativo a través de un proceso necrótico [95]. Además se encontró que en células MA104 infectadas con rotavirus OSU presentaron pérdida de integridad de la membrana celular pero sin proceso de fragmentación del DNA o formación de cuerpos apoptóticos, por lo cual se sugirió que la muerte celular producida por esta sepa de

rotavirus podría ser por eventos asociados a oncosis (de ónkos que significa hinchazón), un modo de muerte celular inducida por depleción de energía que es inicialmente caracterizada por el incremento del volumen celular y la exposición de la fosfatidilserina en la superficie de la membrana celular, es considerada una forma de necrosis [96].

En un estudio realizado con la cepa de rotavirus Rhesus RRV en células MA104 se observó que se indujo fenómenos característicos de apoptosis al hallarse activación de caspasa 3, fragmentación del DNA y clivaje de poli (ADP) ribosa polimerasa, además se evidenció que se produjo por vía mitocondrial al activar a Bax (un miembro de la familia de proteínas Bcl-2 proapoptóticas) a través de la generación de un cambio conformacional en su estructura y posterior liberación de citocromo c [97]. Esta liberación de citocromo c también se observó en línea celular intestinal humana Caco 2 diferenciadas y polarizadas en las cuales su infección con rotavirus RRV lleva a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la liberación de citocromo c desde la mitocondria y fragmentación del DNA lo que podría sugerir que se está presentando una muerte por apoptosis a través de la vía mitocondrial [98].

En un estudio más reciente se ha encontrado que la proteína NSP4 de rotavirus está asociada a la muerte celular producida por rotavirus al trasladarse a la mitocondria donde interactúa con proteínas residentes tales como el traslocador de nucleótido de adenina (ANT) y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) lo que lleva a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, posterior liberación de citocromo c y activación de las caspasas lo que se asocia con muerte celular apoptótica [99].

En un estudio realizado en 2010 se encontró que en las líneas celulares MA104 y en HT29 infectadas con rotavirus RRV se presentaba externalización de fosfatidilserina lo que sugiere estadio temprano de apoptosis, pero en células Caco2 diferenciadas parcialmente no, además se observó que en Caco2 plenamente diferenciadas se generó fragmentación del DNA en estadios tardíos por lo cual se pudo sugerir que el proceso de muerte celular inducido por rotavirus depende de tipo de célula y grado de diferenciación [100].

2.3. FACTOR NUCLEAR KAPPA B (NFκB) Y ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

2.3.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN NFκB

El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB) es un factor de transcripción que puede inducir o reprimir la expresión de genes por la unión a sitios del DNA ((estos sitios tienen 10 pb, GGGRNNYYCC), en el que N es cualquier base, R es una purina y Y es una pirimidina) conocidos como sitios κB, en los promotores y *enhancers* [101].

La familia NFκB está compuesta por 5 miembros p65 (RelA), Rel B, c-Rel, p50/p105 (NF- κB1) y p52/100 (NF- κB2). Se caracterizan porque tienen un dominio N-terminal conservado de 300 aminoácidos (aa), conocido como “Rel Homology Domain” (RHD) que le permite la dimerización y

la unión al DNA. Además tienen una secuencia conservada de localización nuclear (NLS) que se encuentra en el RHD que le permite interacción con IκBs [102]. RelA, RelB y c-Rel tienen un dominio C-terminal de activación transcripcional por lo cual forman una subfamilia. Las subunidades pueden formar homodímeros o heterodímeros con diferente afinidad por unión al DNA y especificidad de secuencia de DNA [103]. Las proteínas p100 y p105 son procesadas para generar subunidades p50 y p52.

En las células de mamíferos las subunidades permanecen inactivas en el citoplasma unidas a las proteínas inhibitorias IκBs que funcionan uniéndose a la región conservada de localización nuclear NLS de NF-κB [104]. Las proteínas IκBs se determinan por la presencia de cinco a siete repeticiones anquirina en su C-terminal que le permite unión a dominio de dimerización de dímeros de NF-κB [105]; son siete las proteínas miembros de familia IκB, IκBα, IκBβ, IκBε, IκBγ, BCL3 y los precursores p100 y p105. Se ha informado que las proteínas IκBα e IκBβ se unen a NLS de dímeros p65/p50 o p65/cRel, y se observa que IκBs solo se unen a NLS de p65 pero no a NLS de p50 el cual queda libre como señal para migrar al núcleo, una vez allí, la secuencia de exportación nuclear (NES) que posee IκBα genera la señal para salir del núcleo, con lo que el complejo IκBα/ NF-κB se puede hallar en núcleo o citoplasma [106]. Cuando p50 y p52 forman heterodímeros con subunidades Rel son retenidas en citoplasma por IκBs, de lo contrario también se pueden hallar en núcleo.

Se han reportado diferentes vías de activación de NF-κB. La vía canónica o clásica y la vía no canónica. La vía canónica es inducida por estímulos de citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNFα) e interleuquina 1 (IL1), exposición a productos de bacterias como los lipopolisacáridos (LPS) y por acción de receptores tipo Toll (TCR) [103]. Una vez se activa la vía se produce fosforilación de IκBα en las serinas 32 y 36 o IκBβ en las serinas 19 y 23 lo que conduce a la poliubiquitinación y posterior degradación en proteosoma de IκB. Esta fosforilación es producida por el complejo activador IKK de 700-900 kDa conformado por dos subunidades catalíticas IKKβ, IKKα y por una subunidad reguladora NEMO (también conocido como IKKγ). IKKβ tiene un dominio ubiquitin que no tiene IKKα que parece estar relacionada con su actividad catalítica. El complejo IKK se activa por fosforilación de IKKβ en las serinas 177 y 181 mientras IKKα en las serinas 176 y 180 por proteínas TAK1 e IKK. Se ha informado que en la vía canónica principalmente se requiere de NEMO y de IKKβ en el complejo de activación IKK, fosforilación de IKKα no se requiere [107]. Seguido a la degradación de IκB, se produce la liberación citoplasmática de NF-κB, el cual se trasloca al núcleo y se une a sitios κB.

La vía no canónica o alternativa es inducida por estímulos como los ligandos de receptores β-linfotoxina y CD40, por el factor de activación de células B de la familia TNF (B-cell-activating factor of the TNF family BAFF), LPS y por la proteína latente de membrana 1 (LMP1) de virus Epstein Barr [108]. En esta vía es necesaria solo la fosforilación de IKKα por la quinasa que induce NF-κB (NIK). Una vez activa, fosforila el precursor p100 produciendo la subunidad p52 que posterior se une a RelB e induciendo la degradación por proteosoma de p100. Los heterodímeros RelB /p52 que se forman en esta vía tienen afinidad por diferentes sitios κB a los otros heterodímeros producidos por la vía canónica [104].

NF- κ B actúa como factor de transcripción para 150 genes blanco, entre las proteínas codificadas por estos genes se encuentran 27 citoquinas y quimoquinas, las proteínas necesarias para la muerte celular programada, proliferación, inflamación, los receptores necesarios en reconocimiento inmune, las proteínas requeridas para presentación antigénica como las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MCH) entre otras que son necesarias en la respuesta inmune ante microorganismos como virus y bacterias [101]. NF- κ B también puede inducir la expresión de genes relacionados con la respuesta a condiciones de estrés oxidativo tales como la óxido nítrico sintetasa (iNOS) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2) [101].

Estudios demuestran que la infección por rotavirus puede activar a NF- κ B y hacer que se secreten citoquinas pro-inflamatorias [224].

2.3.2. NF- κ B y cáncer

Se ha encontrado que NF- κ B induce alteraciones esenciales para procesos de tumorigénesis en fisiología de células normales. Estimula la proliferación celular al activar genes como IL-2, factor estimulante de colonias granulocito monocitos GM-CSF y ligando CD40 que estimulan la proliferación de células mieloides y linfoides e induce producción de citoquinas que estimulan proliferación celular [109]. Puede inhibir la apoptosis al inducir la producción de proteínas anti-apoptóticas tales como los inhibidores de apoptosis celular (c IAPs), miembros de familia BCL2 [110]. En células tumorales con NF- κ B activo constitutivamente puede generar resistencia al tratamiento, además de promover neoplasias porque evita la muerte de células con daños en el DNA [109]. Puede incrementar la metástasis y angiogénesis al regular la expresión de genes que codifican para quimoquinas que producen migración celular y de interleuquinas como la IL8 que promueve angiogénesis [111].

Existen diferentes tipos de cáncer que se asocian con activación constitutiva de NF- κ B. En leucemias y linfomas por ejemplo puede expresarse el oncogen Rel-v que es menos sensible a la inhibición por I κ B debido a mutaciones, alterando propiedades de unión de NF- κ B a DNA [112]. En estos tipos de cáncer se pueden presentar re-arreglos en genes que codifican para las proteínas I κ B. También se han encontrado altos niveles de NF- κ B asociados a carcinomas como cáncer de seno. Constitutiva activación de NF- κ B está asociado con el estímulo continuo de respuesta inflamatoria y esta a su vez con cáncer, que puede deberse a su acción anti apoptótica evitando la muerte de células pre-cancerosas y a la estimulación de transcripción de proteínas relacionadas con proliferación celular, en el caso de cáncer gástrico niveles altos de NF- κ B activado se encuentran asociados a infección e inflamación por *Helicobacter pylori* [113].

2.3.3. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son una familia de moléculas que se producen constantemente, son transformadas y consumidas como consecuencia del metabolismo aerobio

en todos los seres vivos. Los ROS generados en sistemas vivos son diversos, como: superóxido ($[O_2]^-$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), oxígeno (1O_2), peróxido lípido ($ROOH$), ozono (O_3) y radical hidróxido ($[OH]^-$) [114]. Los ROS pueden llevar a daño celular, pueden actuar como segundo mensajero intracelular dentro de vías de transducción de señales. Las fuentes de ROS son diversas, unas pueden ser generadas como subproducto o producto de desecho de procesos biológicos, otros procesos generan ROS intencionalmente por síntesis molecular dentro de una ruta de transducción de señales o como un mecanismo de defensa celular [115].

La mitocondria es una de las principales fuentes de ROS como consecuencia de la respiración aerobia. En su interior se encuentran los complejos de la cadena transportadora de electrones, la cual transfiere electrones desde NADH y succinato por una vía redox que finaliza en reducción de cuatro electrones de O_2 a H_2O durante síntesis de ATP respiratorio. El proceso puede ocasionalmente liberar moléculas de oxígeno que tienen reducción de 1 o 2 electrones que quedan libres para formar ROS, en especial H_2O_2 y $[O_2]^-$ [116]. La producción de ROS en la mitocondria puede tener beneficios fisiológicos como por ejemplo H_2O_2 producido en la mitocondria puede regular la liberación de dopamina por medio de canales de potasio sensibles a ATP [117]. Otra fuente de ROS fisiológico es el retículo endoplásmico (RE) al realizar el plegamiento de las proteínas que serán secretadas y requieren la formación de un puente disulfuro. Los puentes disulfuro requieren de la proteína Ero 1 la cual provoca oxidación de dos electrones de proteína disulfuro isomerasa (PDI), que introduce el puente disulfuro en proteínas blanco por intercambio thiol disulfuro. Ero1 utiliza O_2 como aceptor de electrones produciendo H_2O_2 por cada puente disulfuro formado. El RE alberga la Nox4 una isoforma de NADPH oxidasa que genera H_2O_2 por reducción de dos electrones de O_2 [114].

Los ROS también pueden ser generados en actividad NADPH-oxidasas (Nox) localizadas en varias membranas celulares, por ejemplo, durante respuesta inmune a patógenos la Nox2 usa NADPH para reducir O_2 y generar superóxido que puede actuar contra patógenos; en el fagosoma el O_2 puede ser convertido en ácido hipocloroso por superóxido dismutasa y mieloperoxidasa, el cual también es antimicrobicida. En este proceso se puede liberar ROS desde el fagosoma al citosol ayudando en el estrés oxidativo celular. Otra fuente de ROS son las ciclooxigenasas y lipooxigenasas dentro de procesos catabólicos y anabólicos [115] y cuando hay interacción ligando – receptor en la que se produce señalización redox regulada por Nox como en el caso de receptor tiroxin quinasa [114, 118].

2.3.4. Especies reactivas de oxígeno y cáncer

Los ROS facilitan la mutagénesis, la promoción y progresión de tumor promoviendo la carcinogénesis. La mutagénesis es producto del daño que puede generar los ROS en el DNA celular, incluidas modificaciones de guaninas ($G \rightarrow T$) [119]. Estas modificaciones se pueden producir en oncogenes o en genes supresores de tumores que a su vez podrían provocar iniciación

del cáncer o en eventos posteriores promover su progresión, también se pueden presentar modificación de bases, re-arreglos de secuencias de DNA y duplicación de genes [120].

El cáncer de seno se ha asociado con daño oxidativo del DNA, por ejemplo en enfermedad inflamatoria del seno a la cual le puede seguir progresión tumoral se ha encontrado un daño en DNA producido por $\cdot\text{OH}$ [121], aductos 8-oxo-dG en DNA producidos por radicales, también han sido reportados como factores importantes en el desarrollo de cáncer de seno [122]. El carcinoma hepatocelular se asocia con infección crónica por virus de Hepatitis B o C e ingestión de aflotoxina, estos virus inducen una condición celular oxidativa que puede provocar mutaciones en el DNA, siendo el daño más común la transversión G \rightarrow T [123]. Los ROS también se han asociado con tumorigénesis de cáncer de próstata.

2.3.5. RELACIÓN VIA NF- κ B Y ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

NF- κ B es un factor de transcripción de genes que participan en la regulación de niveles de ROS en la célula y a su vez ROS puede ejercer un papel inhibitorio o estimulador en la vía de NF- κ B.

Los ROS pueden reaccionar con los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, cuando se encuentran en niveles tóxicos, NF- κ B puede proteger a la célula de estos ROS. Una respuesta adecuada contra niveles altos de ROS permite mantener la célula viva, pero cuando el daño es severo el organismo intenta matar la célula en beneficio de las células circundantes. Es así como se puede inducir la muerte celular por necrosis o apoptosis en células dependiendo del nivel de estrés oxidativo al que está sometida [124].

NF- κ B para intentar proteger a la célula del estrés oxidativo induce la expresión de proteínas antioxidantes como la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) enzima mitocondrial que convierte O_2^- en H_2O_2 [125], a su equivalente en citoplasma la Cobre – Zinc Superóxido Dismutasa (Cu, Zn- SOD SOD1) [126], induce la expresión de la cadena pesada de la ferritina (FHC), que es una proteína que almacena hierro, que no actúa directamente reciclando ROS pero que evita que se produzca la reacción Fenton en la cual se utiliza hierro para la generación de $\cdot\text{OH}$ radical altamente reactivo a partir de H_2O_2 [115]. La metaloproteína 3 es un blanco de NF- κ B en queratinocitos y fibroblastos, contiene cisteínas que permiten reciclar radicales $\cdot\text{OH}$ y O_2^- [127], NAD(P)H deshidrogenasa (quinona) 1 que previene la reducción de un electrón de quinonas que produce especies radicales [128] entre otras que llevan a mantener a la célula viva.

Por otra parte NF- κ B puede inducir la expresión de proteínas que promueven la producción de ROS. Es así como durante la inflamación NF- κ B induce la expresión de la NADPH oxidasa Nox2 que produce la formación de superóxido a partir de NADPH, mecanismo que es usado como sistema de defensa. Induce a la Xantina oxidada/Dehidrogenasa (XOR) que cataliza la interconversión de Xantina y urato en presencia de los cofactores NAD^+ y agua, y a causa de su baja especificidad puede transferir electrones al O_2 y no al NAD^+ generando $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . Otra proteína que puede inducir es la Ciclooxygenasa 2 (COX2) que cataliza un paso limitante en conversión de ácido araquidónico a prostaglandina H_2 (PGH₂) por mecanismo que induce la formación de un radical

tirosil, esta proteína es un agente oxidante necesario para oxigenación de ácido araquidónico [129].

Una vez se tiene claro como NF- κ B puede regular los niveles de ROS induciendo expresión de genes que generan proteínas que intentan proteger a la célula de la producción de ROS, o que por el contrario pueden inducir su formación es necesario evaluar el papel de ROS en la activación de NF- κ B.

Para explicar el papel de los ROS en la vía NF- κ B es necesario entender que ROS puede actuar corriente arriba o abajo de NF- κ B. ROS puede regular directamente los dímeros de NF- κ B, siendo la subunidad p50 la más sensible a la oxidación en su Cys 62, luego de la oxidación se produce la acción de Glutathión S Transferasa que genera un NF- κ B menos activo [130]. NF- κ B sobre regula la proteína INOs que produce óxido nítrico, el óxido nítrico puede generar una N nitrosilación en la misma cisteína 62 de la subunidad p50 produciendo un NF- κ B menos funcional [131]. Otro sistema de regulación es sobre la subunidad Rel A la cual necesita ser fosforilada en la Ser 276 para la expresión de un grupo de genes dependientes de NF- κ B, esta fosforilación la realiza la PKAc y es una modificación dependiente de ROS [132]. Se puede regular corriente arriba de NF- κ B, un ejemplo es el caso de I κ B α que típicamente es fosforilada en las Ser 32 y 36 para llevar a su degradación; el H₂O₂ exógeno puede inducir fosforilación en residuos de tirosina, por lo cual no se degradaría I κ B α , indicando que ROS podría inhibir fosfatasa, lo cual ha sido observado en hipoxia, re-oxigenación seguida de hipoxia e isquemia re-perfusión, *in vivo* [133-136]. La traslocación al núcleo de NF- κ B se ha observado que puede ser debida a la unión de I κ B α fosforilada en tirosina a la subunidad regulatoria de PI3K específicamente a su dominio SH2 lo que podría constituir un mecanismo por el cual PI3K secuestra a I κ B α permitiendo la liberación de NF- κ B y expresión de sus genes blanco [137]. El complejo activador IKK puede ser blanco de ROS, porque el H₂O₂ puede inactivarlo [138, 139], aunque en otros estudios se muestra que IKK es potenciado por el peróxido de hidrogeno por ejemplo incrementando dimerización de NEMO por formación de nuevos puentes disulfuro [140].

2.4. MUERTE CELULAR

Se han descrito diferentes tipos de muerte celular que a menudo son definidas por características morfológicas. El Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) propone un criterio unificado para la definición de muerte celular y todas sus características morfológicas.

La muerte celular se refiere a células que están comprometidas en un proceso que después de una primera fase es irreversible, llegando a un punto de no retorno y, según el NCCD, se podría considerar cuando hay alguna de las siguientes características morfológicas: 1. Pérdida de integridad de la membrana, 2. Fragmentación del núcleo formando cuerpos discretos conocidos como cuerpos apoptóticos 3. Fagocitosis de cuerpos apoptóticos por células vecinas *in vivo* [141]. La muerte celular puede ocurrir por diferentes vías bioquímicas entre ellas se encuentran la apoptosis y necrosis.

Apoptosis

El término apoptosis fue introducido por Kerr et al en el año de 1972 [142], se refiere a aspectos morfológicos encontrados en células en proceso de muerte celular diferentes a los encontrados en necrosis. Estos cambios morfológicos incluyen: redondeamiento de la célula, disminución en el volumen celular (pyknosis), retracción de pseudópodos, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear (karyorrhexis), modificaciones ultra estructurales de organelas citoplasmáticas, aparición de protuberancias en membrana plasmática pero manteniendo su integridad hasta estadios tardíos de muerte, pérdida de vacuolas que contienen citoplasma y organelas (cuerpos apoptóticos) y fagocitosis por células vecinas *in vivo*. El término apoptosis se ha considerado como el mecanismo de muerte celular fisiológico esencial para el desarrollo embrionario, y mantiene la homeostasis celular normal en organismos adultos.

Se reconocen dos vías que llevan a muerte celular apoptótica una la vía extrínseca dependiente de receptores de muerte de superficie que se inicia cuando estos receptores se unen a sus ligandos y la vía intrínseca o vía mitocondrial que es un mecanismo de muerte inducido por estrés celular, ambas vías convergen en activación de caspasas 3 y 7 [143]. Ambas vías requieren de proteínas caspasas (cysteine aspartic acid – specific proteases) una familia de cistein proteasas que son específicas de sustrato, todas clivan después de un motivo tetrapéptido (P4-P3-P2-P1) donde P1 es un residuo de asparagina. Las caspasas tienen estructura similar, se producen como propeptidos o zimógenos inactivos. Contienen dominios que han sido identificados como el dominio de reclutamiento de caspasa (CARD) y el dominio efector de muerte (DED) que permiten interacción con proteínas que contienen iguales dominios. La activación de las caspasas normalmente requiere de procesamiento proteolítico entre subunidades larga y corta, formando un heterodímero, permitiendo activación del sitio activo. Luego dos heterodímeros se dimerizan para formar un heterotetrámero para permitir su función. Las caspasas se pueden dividir en iniciadoras las cuales pueden auto activarse (clivaje y heterodimerización) y activar otras caspasas, o pueden ser efectoras que clivan sustratos por ejemplo durante apoptosis [144].

La apoptosis puede ser inducida por la familia del receptor del factor de necrosis tumoral TNF, por receptores de muerte tales como CD95 (conocido como FAS), el cual se une a CD95L (FASL), receptor TNF 1 (TNFR1), TNFR2, receptor de ligando relacionado con TNF 1 (TRAILR1) y TRAILR2 que inician la maquinaria requerida para apoptosis y necrosis [145]. Cuando el ligando se une al receptor en la membrana plasmática, éste sufre cambios conformacionales en su dominio citoplasmático llamado dominio de muerte, permitiendo el reclutamiento de proteínas adaptadoras como dominio de muerte asociado a TNFR (TRADD), proteína dominio de muerte asociada a FAS (FADD) y posteriormente la unión y activación de la caspasa 8 que puede clivar directamente a las caspasas efectoras 3 y 7 llevando a apoptosis. Además la caspasa 8 puede clivar a BID (BCL-2 homology 3 (BH3)-interacting domain death agonist) convirtiéndolo en BID truncado que se trasloca a la mitocondria induciendo permeabilización de la membrana externa mitocondrial, generando la intersección entre las vías intrínseca y extrínseca [143, 146].

Un cambio común en muchas células apoptóticas es la exposición de la fosfatidil serina (Phosphatidylserine, PS) en la cara externa de la membrana plasmática, por lo cual es considerado

como un marcador de muerte celular por apoptosis. Sin embargo, el proceso bioquímico por el cual la PS es externalizada en la membrana no es completamente claro. Se han reportado varios modelos, uno de ellos sugiere la existencia de una enzima llamada "scramblase" (nextprot.org/db/entry/NX_O15162) que es activada durante la apoptosis capaz de hacer cruzar fosfolípidos como la PS a través de la membrana plasmática, un modelo alternativo sugiere que es debido a un tráfico de liposomas dependiente de calcio.

A pesar de ser un marcador de muerte celular existen diferentes líneas celulares que sufren apoptosis y presentan muy poco incremento en su unión a la Anexina V [147], se ha reportado que en líneas celulares de cáncer humano esta situación puede ser debida a que el tráfico de liposomas hacia la superficie es un proceso dependiente de calcio, el cual es deficiente en una buena parte de estas líneas. Es así como a células de glioblastoma T98G a las cuales se les indujo la muerte con TRAIL se detectó que presentaban características típicas de apoptosis como fragmentación nuclear, clivaje de procaspasas y sustratos de caspasa pero no eran positivas para Anexina V, esto mismo se observó en células T98G incubadas con etoposide, células Daudi expuestas a camptothecin y D32 tratadas con TRAIL [148].

La vía intrínseca o mitocondrial depende del desarrollo de citotoxicidad, daño al DNA, privación de factores de crecimiento, estrés en retículo endoplásmico y es regulada por proteínas de la familia BCL-2. El inicio de esta vía requiere de la permeabilización de membrana externa mitocondrial (PMEM) y pérdida del potencial de membrana mitocondrial que es el voltaje diferente que existe entre el lado interno y el lado externo de la membrana, es esencial para muchas de las funciones mitocondriales como la síntesis de ATP, homeostasis de iones y la entrada de proteínas a la matriz mitocondrial [142]. Para generar PMEM y pérdida del potencial de membrana se da la activación por cambios conformacionales de proteínas Bak integrada a membrana mitocondrial externa (MEM) y Bax que requiere su traslocación desde el citosol, una vez en la MEM oligomerizan formando poros [143, 149-151], permitiendo la salida de moléculas del espacio interno mitocondrial tales como citocromo c que hace parte de la cadena transportadora de electrones durante proceso de fosforilación oxidativa y SMAC DIABLO que inhibe a XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) un inhibidor de la caspasa 9, 3 y 7 [152]. Una vez citocromo c es liberado se une a monómeros de APAF1 (apoptotic protease-activating factor 1) causándole cambios conformacionales e induciendo su oligomerización y ensamble en una estructura heptamérica llamada apoptosoma, en un proceso dependiente de ATP. Posteriormente recluta y activa la procaspasa 9. La activación de procaspasa 9 se produce por auto procesamiento que a su vez hace perder afinidad por el apoptosoma. Este apoptosoma activa caspasas 3 y 7 que se encargan de clivar sus respectivos sustratos y llevar a muerte celular. Se ha informado que las caspasas tienen un sustrato en la mitocondria, una subunidad del complejo I de la cadena respiratoria p75 que una vez es procesado e induce formación de especies reactivas de oxígeno, disminución de niveles de ATP, pérdida de potencial de membrana mitocondrial, y producción de especies reactivas de oxígeno [153], todo esto contribuyendo a la muerte celular.

2.4.1. Necrosis

Las células bajo este tipo de muerte celular según la NCCD se pueden identificar morfológicamente por ganancia de volumen celular, presencia de organelas prominentes, la ruptura de la membrana plasmática y subsecuente pérdida de membrana intracelular [141]. Otros autores proponen que existen características adicionales como incremento del efecto translucido del citoplasma, menos modificaciones ultraestructurales del núcleo como la dilatación de la membrana nuclear y condensación de la cromatina en pequeños parches encontrados en otros tipos de muerte, por el contrario sus núcleos pueden permanecer intactos y encontrarse en tejido necrótico además de que no se fragmentan como las células bajo apoptosis [145].

Anteriormente se consideraba que era una muerte accidental no controlada, pero en la actualidad se tiene evidencia de que es un proceso regulado a través de vías de transducción de señales [154]. En 2005 se introdujo el término de necroptosis, expresión que indica una necrosis regulada (opuesto a accidental) [141, 145].

El inicio de la necroptosis comienza con activación por el microambiente celular, siendo la más conocida la vía de TNFR1 que puede desencadenar muerte celular por las vías de apoptosis o necrosis. Esta vía inicia cuando el TNFR1 se une a su ligando natural TNF, lo que induce cambios conformacionales en su dominio citosólico lo que permite ensamble intracelular con otras moléculas como TRADD, con la proteína de unión a receptor 1 (RIP1, o conocida como RIPK1), proteínas inhibitoras de apoptosis celular (cIAPs) entre otras, formando un complejo que se conoce como complejo I. Posteriormente este complejo TNFR1 - TNF se internaliza lo que permite que interactúe con nuevas moléculas de RIP1, RIP3, TRADD, FADD y caspasa 8 formando un complejo que se conoce como el complejo DISC (complejo de señalización que induce muerte) o complejo II [155]. Luego dependiendo de la actividad de la caspasa 8 presente en el complejo II se puede dar inicio a muerte celular dependiente de caspasas, en la cual la caspasa 8 cliva a RIP1, evitando la formación de complejo con proteína RIP3 e impidiendo la fosforilación de RIP1 en Ser 161 por autofosforilación o fosforilación mediada por RIP3 necesaria para el proceso necrótico; o por otro lado en caso de que la caspasa 8 este inactiva, RIP1 se une a RIP3, es fosforilada y permite que se un proceso de muerte independiente de caspasas [156].

Durante la vía de apoptosis hay procesos que consumen ATP que son detenidos por la acción de las caspasas, pero que durante la ejecución de la necrosis iniciada por el TNF, los procesos persisten durante toda la vía, lo que permite la depleción de ATP intracelular, entre estos procesos se encuentra la actividad de la Poli ADP Ribosa Polimerasa PARP1. Se ha informado que la sobreexpresión de PARP1 podría estar asociada con la respuesta a TNF en células L929 de fibrosarcoma, en la cual se induce necrosis y producción de ROS que dañan el DNA [157]. Cuando hay daños en el DNA, como por ejemplo la alquilación, la PARP1 al producir su respuesta causa depleción de NAD y ATP, estimulando la liberación del factor de inducción de apoptosis (AIF), desde el espacio mitocondrial hacia el núcleo. Para ser liberado, se requiere primero cortar a IAF generando una forma truncada, un proceso que es dependiente de las proteasas no caspasas como las calpainas o las catepsinas [158, 159], la presencia de estas proteínas es característica de la necroptosis según la NCCD [141].

De otro lado la producción de ROS por la mitocondria es crucial en la respuesta necrótica al TNF [160]. Se ha evidenciado que la RIP3 puede interactuar físicamente y activar enzimas como la glicógeno fosforilasa (PYGL, que cataliza la conversión de glicógeno en la glucosa 1 fosfato estimulando la glicolisis la cual se asocia con generación de ROS), la glutamato deshidrogenasa 1 (GLUD1, es una enzima de matriz mitocondrial que convierte glutamato en α - ketoglutarato) y la glutamato ammonia ligasa (GLUL, enzima citosolica que permite formación de glutamina, aa que puede ser fuente de energía en la mitocondria). Estas enzimas median pasos claves en la utilización de sustratos en el metabolismo energético asociado a la producción de ROS [161]. Otra fuente de ROS asociada a muerte por necrosis inducida por TNF es la NADPH oxidasa Nox 1 que es reclutada por RIP1 a la membrana plasmática [162]. Estos ROS pueden reaccionar con ácidos grasos poli-insaturados de membranas celulares generando aldehídos, si ataca fracciones de membrana podría alterar su integridad [163]. También se han identificado especies reactivas de nitrógeno asociadas a muerte celular generada por RIP1 – RIP3 producidas por la subunidad NDUFB8 del complejo I [164].

2.5. PROTEINAS CELULARES

2.5.1. Proteína de choque térmico 90 kilodalton (HSP90)

Las proteínas de choque térmico (HSPs) son una familia de proteínas altamente conservadas, ayudan en el plegamiento y ensamble de polipéptidos nacientes, reconocen y unen las proteínas que no tienen una conformación nativa debido por ejemplo a la desnaturalización por estrés celular, o porque los péptidos no están completamente terminados, no poseen un correcto plegamiento o ensamble, o están ubicadas en un compartimento que no le corresponde. Ese estrés celular puede deberse a las temperaturas extremas, la depleción de nutrientes, la concentración extrema de iones o gases entre otros [165]. Estas funciones hacen que tomen el nombre de chaperonas moleculares. Las HSPs son llamadas proteínas de estrés y su expresión se da en repuesta a estrés.

La HSP90 tiene tres dominios un N-terminal que le permite un sitio de unión al ATP o drogas y motivo de unión a las co- chaperonas, un dominio medio que permite unión con las proteínas y co chaperonas y un dominio C-terminal que permite dimerización y unión a co-chaperonas [166]. HSP90 es principalmente una proteína citoplasmática pero también se puede encontrar en superficie celular y en espacio extracelular [167]. En superficie celular se ha encontrado que esta incrementada en las células tumorales más que en las células normales y se asocia con metástasis [168].

La HSP90 participa en modulación de varios eventos nucleares, y se conoce bien su papel en regular la locación del receptores de la hormona esteroidea (SHRs) (importante para ejercer la actividad hormonal esteroidea), además de la estabilidad del receptor esteroideo, unión a ligando y actividad transcripcional [169]. Hsp90 participa en la regulación de factor de transcripción del choque térmico 1 (HSF1) que permite producción de las proteínas HSPs incluida la HSP70; regula

las proteínas como la arginina metil transferasa que modifica la cromatina y se aumenta en algunas líneas celulares de cáncer [170]. Regula el producto del gen SMYD3, la histona metil transferasa, proteína que promueve la proliferación celular y que se encuentra incrementada en diferentes cánceres como el carcinoma hepatocelular y el cáncer colorectal [171]. Permite el plegamiento de la proteína DNA polimerasa η (eta) en una forma activa que media eventos mutagénicos en las células irradiadas con luz UV [172]. La HSP90 en las células tumorales favorece la función de las oncoproteínas, dado que se han identificado varias proteínas que son marcadores de cáncer que son reguladas por HSP90; esto ha permitido que se investiguen varios inhibidores de Hsp90 que se encuentran bajo pruebas clínicas, como el 17-AAG que se encuentra en fase III [166].

2.5.2. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ)

Los PPARs son una familia de factores de transcripción activados por ligandos, se encuentran en especies de mamíferos, y se encuentran relacionados con procesos de inflamación, diferenciación y supervivencia celular. Son activados por ligandos que provienen del metabolismo de ácidos grasos y de la dieta, que permiten la expresión de genes que participan en las vías de lípidos y glucosa, reguladas por PPARs [173]. Para poder ejercer su función inicialmente se deben unir a sus respectivos ligandos produciendo un cambio conformacional que permite liberarse de su co-represor, la histona desacetilasa, lo que induce que se heterodimerice con el receptor X retinoico (RXR). Luego es reclutado a un complejo formado por la histona acetil transferasa y la RNA polimerasa II, este complejo se une a la región de respuesta en genes blanco, remodelando la cromatina e incrementando la transcripción [174].

PPAR γ es expresado predominantemente en el tejido adiposo, la glándula adrenal, el bazo y es un regulador de diferenciación de adipocitos [175]. Se encuentran en otros tipos celulares regulando la inflamación y el metabolismo de lípidos y glucosa por ejemplo en macrófagos [176]. Las tiazolidinediones (TZDs) se utilizan como tratamiento para incrementar la sensibilidad a la insulina, porque son activadores de los PPAR γ e inductores de adipogénesis y almacenamiento de lípidos, disminuyendo los niveles de lípidos en suero [177].

Los ligandos de PPAR γ incluyen ácidos grasos oxidados insaturados, eicosanoides y prostaglandinas en el orden de micromolar [178]. Se han encontrado ligandos que se unen con baja afinidad y están en bajas cantidades como para inducir su activación, mientras otros derivados del ácido linoleico nitrados activan a PPAR γ tanto como TZDs [173]. Se ha informado que PPAR γ puede modular la expresión a la baja de genes COX 2 que cataliza un paso limitante en la conversión del ácido araquidónico a prostaglandina H2 precursor de diferentes prostaglandinas incluida la 15d-PGJ2. PPAR γ disminuye la expresión de COX2 en las células de cáncer de colon HT29, de seno y en las células PC3 de cáncer de próstata [179-181].

La expresión de PPAR γ en líneas celulares tumorales se asocia con arresto del ciclo celular y expresión de genes que codifican para proteínas que participan en diferenciación celular como el antígeno carcinoembrionario o la fosfatasa alcalina, además de cambios en la morfología que indican diferenciación celular [182, 183]. Agonistas de PPAR γ pueden modular la expresión de

reguladores del ciclo celular tales como la ciclina D1 [184], se evidencio en las células MCF-7 de cáncer de seno que PPAR γ induce inhibición en su crecimiento gracias en parte a la degradación, dependiente de proteosoma, de la ciclina D1 [185]. PPAR γ puede incrementar la apoptosis por incremento de las proteínas proapoptóticas BAX y BAD [186, 187], inhibiendo la función de proteínas anti apoptóticas como BCL-XI y BCL2 [186, 188] e incrementando la expresión de PTEN [189]. También debido a que el cáncer está asociado con la inflamación crónica, y esta inflamación está presente en diferentes tipos de cáncer como colorectal, hígado y pulmón y a su vez esto se relaciona con actividad de NF- κ B, agonistas de PPAR γ pueden inhibir expresión de proteínas pro inflamatorias como COX 2 mencionadas anteriormente, IL-6 y TNF a través de interferencia directa de la actividad de NF- κ B. PPAR γ se expresa en las células tumorales y las células del sistema inmune que infiltran el tumor y parece tener actividades anti-inflamatorias en muchos tipos celulares [190, 191].

2.5.3. Proteína disulfuro isomerasa (PDI)

La enzima PDI hace parte de la familia tioredoxin de Proteínas Disulfuro Isomerasas de la cual también hacen parte las proteínas ERp18, ERp44, ERp46, ERdj5, la proteína transmembrana relacionada con tioredoxina 2 (TMX2), PDILT, PDIp, ERp57, ERp72, P5, PDIr, ERp28 y TMX [192]. Está familia de PDIs tienen una estructura relacionada, y se les atribuye la catálisis de puentes disulfuro, la reducción o isomerización de las nuevas proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico lo que permite inducir la estabilidad estructural y la función de muchas proteínas que serán enviadas a las membranas celulares o serán secretadas, además cumple funciones de chaperonas porque puede asociarse con proteínas y péptidos asegurando el apropiado plegamiento de los polipéptidos sintetizadas [193]. En altas concentraciones funciona evitando agregados de proteínas mal plegadas por la rápida formación de puentes disulfuro, mientras a bajas concentraciones tiene actividad anti-chaperonas facilitando agregación [194, 195]

La PDI tiene una estructura multi-dominios, dos dominios que contienen los sitios catalíticos a y a' separados por dos dominios b y b'. Los dominios catalíticos a y a' contienen un motivo catalítico CXXC, los dos residuos ubicados entre Cys les permite en mayor medida realizar la función de óxido reducción de puentes disulfuro. Para procesos de isomerización son requeridos los dominios a y a' como también el dominio b' [192]. El dominio b' media principalmente la unión al poli-péptido, aunque para la unión a las proteínas mal plegadas otros dominios son necesarios [196]. Es una proteína de 508 aminoácidos (EC 5.3.4.1 de homo sapiens), posee en su N-terminal una secuencia señal (20-30 aa) que le permite interactuar con la partícula de reconocimiento de señal y ser llevado por el ribosoma al retículo endoplásmico (RE), una vez llega allí es removido, además en su extremo COOH tiene una secuencia KDEL por medio de la cual es retenido en el lumen del RE [197].

La PDI se puede encontrar en la superficie celular y extracelular en diferentes tipos de células como los hepatocitos, células exocrinas pancreáticas, células endoteliales, plaquetas activadas, además de compartimentos celulares como el citosol, la mitocondria y en el núcleo. La función de

PDI secretada solo se conoce en los tirocitos de la glándula tiroidea, participando en el control del plegamiento y limitando la extensión de multímeros de la tiroglobulina al lado de la proteína Bip (proteína de unión a tiroglobulina) [197]. La PDI de superficie celular se puede encontrar debido a interacciones electrostáticas de PDI secretada y las proteínas de superficie celular [198]. Se ha informado que puede cumplir funciones asociadas a mecanismos de óxido reducción en el exterior de la célula generando reorganización de moléculas y permitiendo la unión de éstas a las células como en el caso de células de fibrosarcoma o de leucocitos. Sin embargo, en las células B de leucemia linfocítica crónica se encontró que PDI en la superficie celular inhibe la unión de Bacitracina [199]. El incremento de tioles en la superficie celular se asocia con activación de los linfocitos, infección por HIV y leucemia [200, 201], activación de plaquetas, adhesión celular, transporte de óxido nítrico [197]. La PDI se ha relacionado con la entrada a la célula de toxina diftérica y su citotoxicidad [202], capacidad infecciosa de HIV [203], virus Sindbis [204] y rotavirus [204].

La PDI ha sido estudiada en cáncer y se ha demostrado que puede actuar induciendo oncogénesis y sobrevida además de resistencia al tratamiento. Los niveles de PDI incrementan en respuesta a estrés. Su presencia es necesaria en este proceso porque su actividad de óxido reducción de tioles sobre otras proteínas que participan en respuesta a estrés celular permite a la célula tumoral no morir. Así, la inhibición de PDI puede sensibilizar a la célula tumoral a la muerte por estrés. PDI es sobre expresada en glioma invasivo, la utilización de un anticuerpo dirigido contra PDI o un inhibidor específico como bacitracina reduce la invasión y la progresión de tumor in vitro [205], además se ha encontrado que puede inducir por parte del sistema inmune la generación de anticuerpos en las células tumorales que expresan FSC- GM [206]. Se ha observado su expresión en varias líneas tumorales humanas y de ratón [205, 206].

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Los tumores son heterogéneos, por lo cual se pueden presentar diferencias entre tumores de distintos órganos o en el mismo órgano de diferentes pacientes, incluso diferencias entre células del mismo tumor [207]. Esto ocurre porque las células tumorales recurren a diversos eventos moleculares, los mismos que permitieron el proceso evolutivo de las especies, explicando la diversidad de respuestas al hacer el tratamiento con radio terapia o quimioterapia. Explica porque el tratamiento no siempre mata las células del tumor o todos los tumores del mismo origen embrionario, favoreciendo que se generen metástasis resistentes a nuevos tratamientos [208]. Los avances en biología molecular, bioquímica y virología molecular permiten proponer a los virus oncolíticos (VO) como nuevo tratamiento contra el cáncer.

La ICH propone lineamientos que permiten evaluar un balance entre el potencial oncolítico del virus y riesgos asociados con el uso del virus que es competente para replicarse. Para esto, proponen primero caracterizar el virus oncolítico evaluando su selectividad. El análisis de la selectividad necesita de ensayos de citotoxicidad in vitro y/o replicación en células permisivas (tumorales) y no permisivas (células normales).

El Laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia se aislaron cinco cepas rotavirales que infectan y lisan la línea celular Sp2 Ag-14 (mieloma de ratón), U-937 (linfoma histiocítico), REH (leucemia linfoblástica aguda), Kato III (carcinoma gástrico), J774 (sarcoma de células reticulares), MDA y MCF-7 (adenocarcinoma de mama), PC3 (adenocarcinoma grado IV de próstata), sugiriendo que las cepas estudiadas son potenciales virus oncolíticos. Sin embargo, no se ha profundizado en los mecanismos que conducen a la muerte celular y posterior lisis celular. Por ésta razón, este trabajo pretende identificar marcadores de muerte celular que produce rotavirus WTEW en líneas celulares REH y U-937 para proponer un mecanismo de muerte celular.

4. JUSTIFICACIÓN

Para seguir las recomendaciones indicadas por La ICH para el desarrollo de VO, primero se deben realizar ensayos *in vitro* en líneas celulares permisivas y no permisivas a la infección para evaluar la citotoxicidad generada por el VO. Rotavirus tiene la capacidad de infectar líneas celulares de cáncer como células Caco 2 [4] y células HT-29 de adenocarcinoma colorrectal [209], además de causar oncólisis en células MA104 [7]. Trabajos previos en el laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de medicina de la Universidad Nacional, se encontró que al evaluar las células Sp2-Ag14 y U937 infectadas por rotavirus presentan permeabilidad de la membrana citoplasmática, se encuentran señales de inducción de muerte celular por apoptosis y disminuye el número de células durante el proceso infeccioso, sugiriendo que la infección viral trae como consecuencia primero apoptosis y luego lisis celular. Nuestros resultados no permiten diferenciar si estas señales pro-apoptóticas son desencadenadas por el virus o por la célula en respuesta a la infección. En la literatura existen reportes mencionando que la infección por el rotavirus induce muerte celular por apoptosis en las células intestinales humanas Caco-2 [6] y oncosis en células MA104 [7], induciendo alteración en la integridad de la membrana citoplasmática, sin ocasionar fragmentación del DNA o formación de cuerpos apoptóticos. Reportaron que la proteína rotaviral NSP1 suprime en las primeras 8 h.p.i. la muerte celular prematura por apoptosis, activando señales de supervivencia vía PI3K y después de las 8 h.p.i. la célula muere por apoptosis [8]. Igualmente, en trabajos previos de nuestro laboratorio se encontró que las cepas de rotavirus seleccionadas en el laboratorio infectan y lisan la línea celular Sp2 Ag-14 (mieloma de ratón), U-937 (linfoma histiocítico), REH (leucemia linfocítica aguda), Kato III (carcinoma gástrico), J774 (sarcoma de células reticulares), MDA y MFC-7 (adenocarcinoma de mama), PC3 (adenocarcinoma grado IV de próstata), sugiriendo que las cepas estudiadas son potenciales virus oncolíticos. Sin embargo, las señales de inducción de muerte celular por apoptosis encontrada en estas líneas tumorales analizadas, fue al cabo de 12 horas post-infección. Es decir, hay evidencias preliminares que sugieren lisis celular por mecanismos apoptóticos, pero no se ha profundizado en determinar a cuanto tiempo de la infección se inician las señales de muerte, ni se han precisado los eventos bioquímicos característicos de muerte celular en líneas U937 y REH infectadas con rotavirus, por ejemplo, la relación con producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y si estos efectos se modifican al aplicar inhibidores de la vía NFκB en líneas U937 y REH infectadas con rotavirus WTEW. En este trabajo se tomó la decisión de utilizar una sola cepa intentando aprender más del proceso antes de continuar con el estudio con las otras cuatro cepas aisladas y con otras líneas tumorales, trabajo que es para una tesis de doctorado o varias de maestría.

5. OBJETIVOS

5.1.1. Objetivo general

Determinar marcadores de muerte celular en líneas U937 y REH infectadas con rotavirus WTEW.

5.1.2. Objetivos Específicos

- Determinar eventos bioquímicos y morfológicos característicos de muerte celular en líneas U937 y REH infectadas con rotavirus WTEW.
- Determinar producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en líneas U937 y REH infectadas con rotavirus WTEW.
- Analizar el efecto sobre ROS y proteínas relacionadas con NFκB al aplicar inhibidores de la vía NFκB en líneas U937 y REH infectadas con rotavirus WTEW.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Líneas celulares

La línea celular REH proviene de células obtenidas de leucemia linfocítica aguda (no T; no B) pre B de humano (*Homo sapiens*), con morfología linfoblástica. La línea celular U-937 (ATCC CRL-1593.2) proviene de células malignas obtenidas de un hombre caucásico de 37 años con linfoma histiocítico, con morfología monocítica. Ambas líneas tienen un nivel de bioseguridad 1 y crecen en suspensión. U-937 pueden ser inducidas a diferenciación monocítica por sobrenadantes de cultivos mezclados de cultivos de linfocitos, son negativas para producción de inmunoglobulina y expresión de virus de Epstein Barr, expresan antígeno Fas, y son sensibles a TNF y anticuerpos anti Fas. [210, 211]. Las líneas celulares REH y U-937 se cultivan en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco®) suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (SFB) (Gibco®) más 20 U/ml de Penicilina con 40 U/ml de estreptomina (Invitrogen®) e incubadas a 37 °C con 5% de CO₂. El cultivo y los doblajes poblacionales se realizaron en cabina de flujo laminar bajo estrictas condiciones de esterilidad cambiando el medio de cultivo cada tres días.

6.2. Anticuerpos y reactivos

Tabla 3: Reactivos utilizados.

Reactivo	Marca	Concentración
Anexina-V Alexa 568	Roche®	Cat. No. 03703126001. 500 µl (250 test)
Anti-Cox-2	Santa cruz Biotechnology®	(M-19) sc-1747 Lot # E2506. IgG Goat Polyclonal
Anticuerpos conjugados con FITC	Santa cruz Biotechnology®	Sc-2024 Lot # L0502 (200 µl/ml)
Anticuerpos conjugados con HRP	Santa cruz Biotechnology®	Sc-2020 Lot # C1207 (200 µl/0.5 ml)
Anti-Hsp90	Santa cruz Biotechnology®	(N-17) sc-1055 Lot # J1308. IgG Goat Polyclonal.
Anti-Nf-Kb- P p50 (ser 337)	Santa cruz Biotechnology®	Cat. No. SC33022 (200 µg/ml)
Anti-PDI	Santa cruz Biotechnology®	(E-20) SC-17222 Lot # B2207. IgG Goat Polyclonal. (H-160) SC-20132 Lot # B2103. IgG Rabbit Polyclonal.
Anti- PPAR gamma	Santa cruz Biotechnology	Cat. No. SC6285
Anti- IKB alfa	Santa cruz Biotechnology	Cat. No. SC271782
DMEM	Thermo scientific®	Cat. No. SH30565.02
Hoechst 33342	Thermo scientific®	Cat .No. 62249 (12.3mg/ml)
In situ cell death	Roche®	Cat. No. 11684795910 (50 test)
Ioduro de propidio	Invitogen®	Cat. No. P3566 1mg/ml
MEM	SIGMA®	Cat No. D5671
PARP (poli-ADP-Ribosa Polimerasa)	Roche®	Cat. No. 11835238001. 100 µl (50 blots)
SFB	BioWhittaker™	Cat. No. 14-502F
Dihydroethidium (DHE)	Thermo scientific®	Cat. No. 8401001 (2 mg)
Ac-DEVC-AFC Caspase 3 Fluorogenic Substrate	BD Pharmingen	Cat. No. 556574 (1 mg)
Ac-IETD-AFC Caspase 8 Fluorogenic Substrate	BD Pharmingen	Cat. No. 556552 (1 mg)
Z-VAD-FMK	BD Pharmingen	Cat. No. 550377 (1 mg)
DiOC6(3) (3,3' Dihexyloxa carbocyanine Iodide)	Invitrogen®	Cat. No. D-273 Lot # 1315500 (100 mg)
N-acetilcisteina	Sigma	Cat. No A7250 Lot # 118K00491 (100mg/ml)

6.3. Cepas de rotavirus.

El aislamiento de rotavirus WTEW fue obtenida por trabajo previo realizado por el director del proyecto para lo cual seleccionó cepas de rotavirus con capacidad de infectar líneas tumorales en dos etapas.

La primera etapa consistió de obtener cepas parentales. Unas fueron donadas por el laboratorio del Dr. Carlos Arias de la UNAM, México: TRF (cerdo), RRV (mono Rhesus), UK (bovino), Ym (cerdo); cepas de origen humano Wa, Wi61 (G9P [8]), M69 (G8), todas adaptadas a la línea celular no tumoral de riñón de mono verde MA104. Mientras otras cepas silvestres humanas se aislaron de heces de 5 niños Bogotanos, por el director del proyecto. Se demostró que las cepas seleccionadas, en líneas tumorales habían ganado capacidad infecciosa respecto a las parentales. A estas cepas de rotavirus se les hizo más de 100 pasajes en líneas tumorales que sobre-expresan proteínas HSPs.

En la segunda etapa, el director del proyecto mezcló dichas cepas, así:

1. Rotavirus TRF, (cerdo), RRV (mono Rhesus), UK (bovino) y Ym (cerdo) a esta mezcla se le denominó **TRUY**.
2. Rotavirus Wa, Wi61 y M69, a esta mezcla se le denominó **WWM**.
3. Se mezclaron las cepas de origen humano aisladas de heces y se le denominó **Wt1-5**

Con el objeto de facilitar el surgimiento de una variante de rotavirus a partir de esta mezcla de rotavirus, (TRUY, WWM, WT1-5) se les hizo de nuevo más de 100 pasajes en líneas celulares tumorales que sobre-expresan proteínas HSPs. Al mezclar, facilita que los virus de diferente cepa infecten una misma célula y dentro de la célula haya intercambio de segmentos, porque tienen el genoma segmentado. Esto posibilita el surgimiento de nuevas variantes a partir de la mezcla.

4. La cepa silvestre que infecta ratones, denominada **ECwt** se mantuvo pura, mientras se seleccionó en líneas tumorales, para utilizarla en el modelo murino, *in vivo*. Esta cepa fue donada por Henry Greemberg de la Universidad de Stanford a través del Dr. Manuel Franco, Universidad Pontificia Javeriana, de Bogotá.

5. Una vez se hicieron los pasajes mencionados a TRUY, WWM, WT1-5, de nuevo se mezclaron todos los virus, junto con la cepa que se mantuvo pura (ECwt) y se denominó **WTEW** (mezcla de **Wt1-5**, **TRUY**, **ECwt**, **WWM**). Igualmente, con el mismo objetivo a lo descrito antes, de nuevo se les hizo de más de 100 pasajes en líneas celulares tumorales que sobre-expresan proteínas HSPs [223].

6.4. Técnicas utilizadas

6.4.1. Infección de líneas U937 y REH.

Para las pruebas de infección las líneas U937 y REH se descartó el medio de cultivo, se les realizaron lavados con medio MEM para retirar el suero fetal bovino (SFB). Se adicionó medio sin SFB. Para ambas líneas, U937 y REH, 5×10^4 células se sembraron en cada pozo de cajas de 96 pozos, se adiciono rotavirus WTEW MOI 2 previamente activado con tripsina (1ug/l ml). Las células se cosecharon a la 1, 3, 5, 7, 9, y 11 h.p.i. y se fijaron con formaldehído al 4% por 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron dos veces con PBS, fueron re-suspendidas en PBS con 0,02% de azida de sodio y se almacenaron a 4% (vol/vol) hasta su utilización.

Para evaluar si durante la infección el virus se replicó y formó viriones con capacidad infecciosa, primero se infectó la línea celular REH con un MOI de 2 y se cosechó a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i.. Las células cosechadas se congelaron tres veces a -20°C , y se descongelaron para lisar las células y favorecer la liberación de viriones. Se adicionó tripsina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 30 minutos y con el lisado se re-infectaron nuevas células y se cosechó a las 11 h.p.i., se fijaron y la infección se evaluó mediante inmunocitoquímica, como se describió anteriormente.

6.4.2. Inmunocitoquímica

Para determinar si el rotavirus WTEW infecta las líneas celulares U937 y REH se tomaron aproximadamente 25.000 células U937 y REH y se fijaron sobre cubreobjetos previamente limpiados con xilol, se llevaron a 50°C por 24h para deshidratarlas, se fijaron con glutaraldehído al 2,5% (vol/vol) por 20 min a temperatura ambiente, luego se permeabilizaron con 0,5% de triton X-100 (vol/vol) por 5 min a temperatura ambiente. Se adicionó anticuerpo (Ac) policlonal dirigido contra proteínas estructurales y no estructurales (NSP4 y NSP5) del rotavirus generado en nuestro laboratorio (1:2000 vol/vol), se incubo por 1 hora a 37°C en cámara húmeda, se realizaron tres lavados con PBS, posteriormente se adicionó el Ac secundario anti conejo IgG conjugado con peroxidasa (0,133 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Santa cruz Biotechnology®) y se incubo por 1h en cámara húmeda a 37°C , las células se lavaron tres veces con PBS y su revelado se realizó utilizando como sustrato aminoetilcarbazol (AEC), 0.64 mg/ml, buffer acetato (acetato de sodio 30 mM, ácido acético 12 mM) pH 5.0 y peróxido de hidrógeno al 0.36%. El AEC fue preparado previamente a una concentración de 4 mg/ml en dimetilformamida. Se incubaron a temperatura ambiente hasta obtener una coloración rojiza. Para el análisis de los antígenos virales se tomaron diez fotografías de cada laminilla en un microscopio de luz (VanGuard) y se contaron las células positivas y negativas para la coloración. El número de células positivas para la coloración indicó las células que contienen los antígenos virales, que a su vez indicó el número de células infectadas. El porcentaje de células infectadas se realizó dividiendo el número de células positivas para los antígenos virales, por el total (positivas y negativas) multiplicado por 100. Como control se utilizaron células no infectadas incubadas con los mismos anticuerpos.

6.4.3. Anexina V

Durante estadios tempranos de apoptosis ocurren cambios en la superficie celular, uno de las alteraciones que ocurren en la membrana plasmática es la traslocación de la fosfatidil serina (PS) desde la parte interna de la membrana hacia la parte externa de la célula.

La anexina V es una proteína que tiene afinidad por la PS, para unirse a la PS requiere de calcio por lo cual se prepara el buffer HEPES que mantenga las condiciones celulares. Tiene un espectro de excitación en un rango de 488 – 566 nm y un espectro de emisión por encima de los 600 nm.

Para evaluar la exposición de la PS en las líneas REH y U-937 infectadas con rotavirus WTEW, las células fueron infectadas con un MOI de 2 y se recolectaron las células a las 0, 3, 7 y 11 h.p.i. Como controles se utilizaron células no infectadas recolectadas a las 0, 3, 7 y 11 o células tratadas con 1,0 mM/L de H₂O₂ durante 11 h. posteriormente se lavaron dos veces con PBS. Inmediatamente se re-suspendieron e incubaron en 100 µl de Buffer HEPES/NaOH pH 7,4 con 140 mM de NaCl y 5 mM de CaCl₂ que contenía 20 µl/mL Anexina-V-Alexa 568 (Roche®) durante 15 minutos a temperatura ambiente (~20°C) protegidas de la luz. Posteriormente se analizaron al microscopio de fluorescencia. La morfología observada al microscopio en células no infectadas y tratadas con 1,0 mM/L de H₂O₂ durante 11 horas indicó la exposición de la PS y fue la morfología considerada como positiva para Anexina V. En el análisis estadístico se compararon, el porcentaje de células positivas para Anexina V en células infectadas con rotavirus WTEW y las no infectadas para cada h.p.i. con el fin de hallar el nivel de significancia.

6.4.4. 7-aminoactinomycin D (7-AAD)

La 7-AAD es una tinción selectiva de DNA, es impermeable a la membrana celular y generalmente excluido de células viables, pero que fácilmente pasa a través de la membrana citoplasmática comprometida. Se une a DNA de doble cadena por intercalación entre pares de bases en regiones ricas en GC. El 7-AAD puede ser excitado en un espectro de 488 nm con el láser de argón y un espectro de emisión de 647 nm. Para evaluar si el virus durante su proceso infeccioso ocasiona pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática, se evaluó la permeabilidad utilizando el reactivo 7-AAD, para esto, las líneas celulares REH y U-937 fueron infectadas con rotavirus WTEW a un MOI de 2, se recolectaron las células a las 0, 3, 7 y 11 h.p.i., luego fueron lavadas dos veces con PBS, se centrifugaron a 0,6 gravedades y se re-suspendieron en 1 mL de buffer PBS + 0.3 mM Ca²⁺ + 0.3 mM Mg²⁺ + 0,2% de BSA + 0,1 % de azida de sodio y 1mg/mL de 7-AAD, durante 20 minutos a 4°C protegidas de la luz. Se realizaron dos lavados con PBS y se analizaron al microscopio de fluorescencia, se tomaron 10 fotos representativas de cada laminilla y se evalúa el número de células positivas para la tinción. Como controles se utilizaron células no infectadas recolectadas a las 0, 3, 7 y 11 h.p.i. y células no infectadas y tratadas con 1,0 mM/L de H₂O₂ durante 11 horas.

6.4.5. Fragmentación nuclear

Para la evaluación de la fragmentación nuclear y la condensación de la cromatina se utilizaron los reactivos Hoechst 33342 (Thermo scientific®) y Ioduro de propidio (Invitrogen®) en células fijadas y permeabilizadas. Estas tinciones se unen a regiones AT del DNA (Hoescht) y al DNA y RNA (Ioduro de propidio) y permiten visualizar cambios en el patrón de distribución de la cromatina. Para esto, las células fueron infectadas con rotavirus WTEW con MOI de 2, como control se utilizaron células no tratadas o células tratadas con 1,0 mM/L de H₂O₂ durante 11 horas. Se cosecharon a la 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i., y se lavaron dos veces con PBS. Se fijaron con formaldehído al 4% y se lavaron tres veces con PBS, luego se permeabilizaron con Triton X100 0,5% por 5 minutos y se lavaron tres veces con PBS. Las células fueron re-suspendidas en 60 µl de PBS con 0,02% (peso/vol) de azida de sodio. Se tomaron aproximadamente 25.000 células que se pusieron sobre cubreobjetos y se adicionaron 25 µg/ml de la solución de Hoechst 33342 o 20 µg/ml de Ioduro de propidio en un volumen de 25 µl por 20 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad, posteriormente se lavaron dos veces con PBS. Las láminas se montaron adicionando glicerol al 70%, invirtiéndolas sobre una lámina portaobjetos y sellando los bordes con resina. Se observaron los cambios de distribución de los patrones de la cromatina en un microscopio de fluorescencia (VanGuard).

6.4.6. Poli (ADP-ribosa) – polimerasa

La poli (ADP-ribosa) – polimerasa es una enzima que reconoce específicamente cadenas de DNA con rupturas producidas por varios agentes genotóxicos permitiendo la reparación del DNA nuclear. Para evaluar si la célula infectada presenta rupturas del DNA y se están induciendo mecanismos de reparación de estos daños se evaluó la proteína Poli ADP Ribosa Polimerasa. Para este caso, se aplicó la misma metodología descrita para inmunocitoquímica. Luego se adicionó 0,5 µl/ml Ac anti Poli – (ADP-Ribosa)- Polimerasa hecho en conejo (Roche®) en PBS y se incubó por 60 min a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con PBS y se adicionó un Ac policlonal IgG anti-conejo conjugado con FITC hecho en cabra (2µg/ml Invitrogen®) por 30 min a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Se lavaron dos veces con PBS, el cubreobjetos fueron invertidos sobre la lámina portaobjetos con glicerol al 70% y se selló con resina. La presencia de la poli (ADP-ribosa) – polimerasa se evaluó en un microscopio de epi-fluorescencia (VanGuard). Los resultados obtenidos son el promedio de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 10 fotografías tomadas para cada una de las líneas celulares y para cada h.p.i. evaluadas. En el análisis estadístico se compararon, el porcentaje de células positivas para PARP en células infectadas con rotavirus WTEW y las no infectadas para cada h.p.i. con el fin de hallar el nivel de significancia. Se hizo un estudio de escala de intensidad de fluorescencia con el software ImageJ para al menos 20 células representativas en cada fotografía de cada condición. Para esto se aplicó la fluorescencia total corregida (CFCT) con la siguiente fórmula $CFCT = \text{Densidad integrada} - (\text{Área seleccionada de la célula} \times \text{Medida de la fluorescencia del área del fondo sin fluorescencia})$. Para el análisis se tomaron 10 fotografías de cada muestra.

6.4.7. TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) assay

La técnica de TUNEL se realizó con el kit *in situ* cell death (TUNEL, Roche) el cual permite analizar rupturas del DNA de cadena sencilla generadas durante procesos de muerte celular, para esto se evalúa la incorporación catalítica independiente de templado de nucleótidos (deoxyuridine triphosphate dUTP) marcados con fluorescein al extremo 3'-OH libre del DNA usando la enzima Terminal Deoxinucleotidyl Transferasa (TdT). Para analizar las rupturas de DNA en líneas celulares REH y U937 infectadas con rotavirus, las células fueron cultivadas e infectadas con rotavirus WTEW a un MOI de 2 previamente activado con tripsina. Como controles se emplearon células no infectadas y células no infectadas y tratadas con 1 mM/L de H₂O₂ durante 11 horas. Se cosecharon a la 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. Se fijaron con formaldehído al 4% y se lavaron tres veces con PBS. Las células fueron re-suspendidas en 60 µl de PBS con 0,02% (peso/vol) de azida de sodio. Se tomaron aproximadamente 25.000 células que se pusieron sobre cubreobjetos, se hizo la técnica de inmunocitoquímica descrita anteriormente. Posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS y se adiciona 0,03 µL para 50.000 de solución de reacción TUNEL por laminilla, se incuban en cámara húmeda por 60 minutos a 37°C en oscuridad, posteriormente se lavaron dos veces con PBS. Las láminas se montaron adicionando glicerol al 70%, invirtiéndolas sobre una lámina portaobjetos y sellando los bordes con resina. Se toman 10 fotografías representativas por laminilla, y se evalúa el número de células positivas y negativas para TUNEL en un microscopio de epi-fluorescencia (VanGuard). Los resultados obtenidos en los ensayos de TUNEL son el promedio de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 10 fotografías tomadas para cada una de las líneas celulares y para cada h.p.i. evaluadas. En el análisis estadístico se compararon, el porcentaje de células positivas para TUNEL en células infectadas con rotavirus WTEW y las no infectadas para cada h.p.i. con el fin de hallar el nivel de significancia. Se hizo un estudio de escala de intensidad de fluorescencia con el software ImageJ para al menos 20 células representativas en cada fotografía de cada condición. Para esto se aplicó la fluorescencia total corregida (CFCT) con la siguiente fórmula $CFCT = \text{Densidad integrada} - (\text{Área seleccionada de la célula} \times \text{Medida de la fluorescencia del área del fondo sin fluorescencia})$. Para el análisis se tomaron 10 fotografías de cada muestra.

6.4.8. Dihydroethidium DHE

En estudios anteriores de nuestro laboratorio se ha encontrado que en enterocitos de ratón infectados con el rotavirus ECwt se produce aumento de ROS [208], por lo cual se quiso identificar si esta misma situación se presenta en las líneas celulares U937 y REH infectadas con rotavirus WTEW. Para evaluar los niveles de especies reactivas de oxígeno se utilizó el kit Cellomics® Oxidative Stress I que tiene como principio que en presencia de ROS el dihydroethidium no fluorescente se convierte a ethidium altamente fluorescente que posteriormente se une al DNA. Para esto, las células fueron infectadas con rotavirus WTEW con MOI de 2, como control se utilizaron células no infectadas. A las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. se adicionó dihydroethidium por 30 min a 37°C y se cosecharon. Las células se re-suspendieron en 60 µl de PBS con 0,02% de azida de

sodio. Se tomaron aproximadamente 25.000 células que se pusieron sobre cubreobjetos se dejaron secar en oscuridad y se adicionó glicerol al 70%, invirtiéndolas sobre una lámina portaobjetos y sellando los bordes con resina. Para todos los casos descritos anteriormente, la fluorescencia se analizó en un microscopio de fluorescencia convencional (VanGuard). La presencia de fluorescencia indicó los niveles de ROS en cada una de las horas evaluadas para cada línea celular. Se hizo un estudio de escala de intensidad de fluorescencia con el software ImageJ para al menos 20 células representativas en cada fotografía de cada condición. Para esto se aplicó la fluorescencia total corregida (CFCT) con la siguiente fórmula $CFCT = \text{Densidad integrada} - (\text{Área seleccionada de la célula} \times \text{Medida de la fluorescencia del área del fondo sin fluorescencia})$. Para el análisis se tomaron 10 fotografías de cada muestra.

6.4.9. 3,3'-dihexyloxcarbocyanine iodide (DiOC₆(3))

El DiOC₆(3) es un marcador lipofílico, de fluorescencia verde y permeable celular que específicamente se acumula en la mitocondria de células vivas cuando se usa a bajas concentraciones. El método se basa en el principio de que la retención de la tinción de DiOC₆(3) en la mitocondria es dependiente de potencial de membrana mitocondrial, con lo cual una disminución en la intensidad de fluorescencia indica decrecimiento en el potencial de membrana. Para evaluar el potencial de membrana mitocondrial de las líneas REH y U-937, éstas fueron infectadas con rotavirus WTEW con un MOI de 2, como control se utilizaron células no infectadas y células no infectadas y tratadas con 1,0 mM/L de H₂O₂ durante 11 horas. A las 0, 3, 7 y 11 h.p.i. tanto a células infectadas como sin infectar se les adicionó 3,3'-dihexyloxcarbocyanine iodide (DiOC₆(3) 2 nM; (Invitrogen) por 15 min a 37°C en oscuridad. Posteriormente se analizaron en microscopio de fluorescencia. Los resultados de dos ensayos se promediaron, cada ensayo hecho por duplicado y del conteo de 10 fotografías tomadas para cada una de las líneas celulares y para cada h.p.i. evaluadas. En el análisis estadístico se compararon, el porcentaje de células positivas para DiOC₆ en células infectadas con rotavirus WTEW y las no infectadas para cada h.p.i. con el fin de hallar el nivel de significancia. Se hizo un estudio de escala de intensidad de fluorescencia con el software ImageJ para al menos 20 células representativas en cada fotografía de cada condición. Para esto se aplicó la fluorescencia total corregida (CFCT) con la siguiente fórmula $CFCT = \text{Densidad integrada} - (\text{Área seleccionada de la célula} \times \text{Medida de la fluorescencia del área del fondo sin fluorescencia})$. Para el análisis se tomaron 10 fotografías de cada muestra.

6.4.10. Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

Con el fin de evaluar la actividad metabólica celular se utilizó la técnica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), que mide la reducción metabólica del MTT intracelularmente vía actividad enzimática por deshidrogenasas, entre las que se encuentran las que hacen parte de la cadena transportadora de electrones específicamente la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial que participan en la cadena respiratoria y su flujo de electrones. La

cantidad de formazan presente por acción de la enzima se presume es directamente proporcional al número de células viables y permite determinar la funcionalidad mitocondrial, se mide por cambios en la absorbancia a 570 nm. Para evaluar la reducción del MTT en células REH y U937 infectadas con rotavirus, las células se infectaron con rotavirus WTEW a un MOI de 2. A las 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i se les adiciono 1 mg/ml MTT disuelto en medio MEM por pozo a una concentración final de 0,45 mg/ml y se incubaron por dos horas a 37°C. Luego las muestras fueron solubilizadas con 100 µL de solución de 10% de SDS en 10 mM de HCL por pozo, se ponen en agitación hasta obtener una completa solubilización de los cristales de formazan y se leen en un lector de Elisa Stat Fax 303/Plus a una longitud de onda de 570 nm. Como control se utilizaron células sin infectar recolectadas a iguales horas que células infectadas y células sin infectar tratadas con 1,0 mM/L de H₂O₂ durante 11 h. El cálculo de células viables se hizo utilizando la fórmula de % de supervivencia: media de valores de densidad óptica de células infectadas o tratadas con H₂O₂ / media de valores de densidad óptica de células sin infectar.

6.4.11. Resazurina

La resazurina es un marcador no fluorescente azul que es reducido a resofurina rosada y altamente fluorescente por oxidoreductasas que se encuentran fundamentalmente en mitocondria de células vivas. La resofurina es excretada al medio donde puede ser medida, permitiendo evaluar el número de células viables, por lo cual los resultados se expresan como porcentajes de supervivencia. Para evaluar la oxidación de resazurina por oxidorreductasas mitocondriales de líneas celulares REH y U937 infectadas con rotavirus, las células se infectaron a un MOI de 2, luego de cumplidas las 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. se les adicionó solución de resazurina disuelta en PBS a una concentración final de 0,4 µM por pozo y se incubaron por 2 horas a 37°C. Posteriormente fueron leídas a una longitud de onda de excitación 535 nm y una longitud de onda de emisión de 595 nm. Como control se utilizaron células sin infectar, recolectadas a iguales horas que células infectadas y células sin infectar tratadas con 1,0 mM/L de H₂O₂ durante 11 h. El cálculo de células viables se hizo utilizando la fórmula de % de supervivencia: media de valores de densidad óptica de células infectadas o tratadas con H₂O₂ / media de valores de densidad óptica de células sin infectar.

Con el fin de evaluar si los porcentajes de supervivencia dados a partir de la oxidación de la resazurina varían según el MOI con el cual las células son infectadas, se realizaron las infecciones de ambas líneas celulares con MOI del virus 10, 4 y 2 a las 7 y 11 h.p.i.

6.4.12. Expresión de proteínas celulares

La infección por rotavirus induce aumento en los niveles de NFκB, COX II, PPARγ, PDI y ROS [208], además se sabe que NFκB puede inducir aumento en los niveles de ROS y viceversa [115] por lo cual se evaluó que sucedió con la infección por rotavirus cuando se expusieron a inhibidores de la vía NFκB o se neutralizaron los ROS. Por esta razón se quiso analizar que sucede con la infección de rotavirus y con los niveles de NFκB, COX II, PPARγ, PDI y ROS cuando se utilizan inhibidores de

la vía NFκB o se neutralizan los ROS. Se eligieron las proteínas NFκB, COX II, IκB y PPARγ porque participan en la vía NFκB, y NFκB aumenta con la infección por rotavirus, la proteína HSP90 porque actúa como un control negativo porque no es influenciada por esta vía y PDI porque es una proteína no relacionada con la vía pero su presencia sí es necesaria porque su actividad de óxido reducción de tioles sobre otras proteínas que participan en respuesta a estrés celular como cuando se aumentan los niveles de ROS durante la infección por rotavirus permite a la célula tumoral no morir. Para esto, las células se sembraron en cajas de 96 pozos se realizó el proceso de infección, luego a 1 h.p.i. se trataron con NAC 30 μM e inhibidores de la vía NF-κB Tiazonilediona 3,3 mM, Pioglitazona 0,15 mM, Rosiglitazona 3,3 mM y Curcumina 30 μM concentraciones que fueron determinadas en trabajos previos de nuestro laboratorio. Luego se cosecharon a las 9 h.p.i debido a que en ambas líneas celulares es en esta hora donde se hallaron niveles de ROS que aumentan significativamente con respecto a la 1 h.p.i., además aumentan los ROS con respecto a las células sin infectar. Se realizó proceso de medición de ROS con DHE como se describió anteriormente. A parte con los remanentes se realizó proceso de inmunocitoquímica con el fin de evaluar niveles de infección. Para evaluar cambios en la expresión de proteínas celulares NF-κB fosforilado, IκB, COX II, PPARγ, PDI y proteína de choque térmico HSP90 4×10^7 células se sembraron en cajas de 96 pozos se trataron con NAC 30 μM (concentración pre-establecida en trabajos previos del laboratorio) y fue evaluada la infección mediante inmunocitoquímica. Luego, se hizo la inmunofluorescencia en estas mismas muestras. Para disminuir la autofluorescencia celular, se adiciono 50mM de cloruro de amonio (NH_4Cl_2) en PBS durante 30 min a temperatura ambiente, se adicionaron los anticuerpos primarios se adiciona Ac de cabra anti COX, PDI y PPARγ y Ac de conejo anti IκB, HSP90 y NFκB fosforilado a una concentración de 0.2 μg/ml, se incubo por 60 min a 37°C en cámara húmeda, se lava tres veces con PBS, luego se adiciona Ac policlonal IgG anti-cabra conjugado con FITC (Santa cruz Biotechnology®) para proteínas COX, PDI y PPARγ a una concentración de 0.5 μg/ml, y Ac policlonal IgG anti-conejo conjugado con FITC (Santa cruz Biotechnology®) para proteínas IκB, HSP90 y NFκB fosforilado a una concentración de 0.57 μg/ml se incuban por 60 min a 37°C protegidas de la luz. Se hicieron dos lavados con PBS. Las láminas cubreobjetos fueron montadas invirtiéndolas sobre una lámina portaobjetos, adicionando glicerol al 70% (vol/vol), y sellando los bordes con resina. Como control se utilizaron células no infectadas, en las cuales se desarrolló el mismo procedimiento. Se hizo un estudio de escala de intensidad de fluorescencia con el software ImageJ para al menos 20 células representativas en cada fotografía de cada condición Para esto se aplicó la fluorescencia total corregida (CFCT) con la siguiente fórmula $\text{CFCT} = \text{Densidad integrada} - (\text{Área seleccionada de la célula} \times \text{Medida de la fluorescencia del área del fondo sin fluorescencia})$. Para el análisis se tomaron 10 fotografías de cada muestra.

6.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el uso del programa GraphPad Prism v5.0® donde se aplicó la prueba de Levene con la cual se encontró que los diferentes datos tienen una distribución normal, posteriormente se aplicó prueba paramétrica de ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple de Tukey donde el nivel de significancia de las pruebas estadísticas se graficaron como: *, **, *** y ns = no significativo; esta prueba aplicó en donde se necesitaba hallar la significancia en las diferentes h.p.i. de las cinéticas. Se aplicó una prueba t-student no pareada para determinar si hay diferencias significativas entre la media de cada tratamiento cuando se requería comparar células infectadas vs células no infectadas en cada h.p.i..

7. RESULTADOS

7.1. El rotavirus infecta, se replica y produce viriones en las líneas REH y U937

Trabajos previos de nuestro laboratorio demuestran que la línea celular U937 es susceptible de infección por aislamientos rotavirales WWM, TRUY y ECwt, además de permitir su replicación y producción de viriones. Además se encuentran antecedentes de susceptibilidad de la línea celular REH a la infección por rotavirus a aislamiento WTEW.

Para corroborar si ambas líneas celulares U937 y REH son susceptibles a la infección por el aislamiento rotaviral WTEW se analizó la presencia de antígenos virales mediante ensayos de inmunocitoquímica. Las células se infectaron a un MOI de 2, luego se cosecharon a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. y se analizó la presencia de antígenos virales utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus utilizando como control células no infectadas. Para determinar el porcentaje de infección se realizó el conteo de células en ambas líneas que presentan antígenos virales, visualizados como una coloración rojiza. Para el conteo se utilizó el programa ImageJ.

El resultado de la inmunocitoquímica mostró que en las células REH a partir de la 1 h.p.i. se presentan antígenos virales con un 18.88%, durante las 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. fueron del 33.45%, 46.20%, 47.11%, 64.12% y 73.14% respectivamente, lo que indica que existe un incremento progresivo de antígenos virales hasta las 11 h.p.i.. Al comparar la 1 h.p.i. con las células no infectadas se obtiene un valor de $P < 0.05$ y al comparar las 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. restantes contra las células sin infectar se obtienen los valores de < 0.001 , estos resultados indican que existen diferencias significativas entre las diferentes h.p.i. con respecto a las células sin infectar.

Se encontró que con la células U937 se presentan antígenos virales desde la 1 h.p.i. con un 20,4%, a las 3 h.p.i se obtiene un 30,6%, a las 5, 7, 9 y 11 h.p.i los porcentajes fueron del 43,95%, 53,125%, 61.54% y 73.1% respectivamente, de nuevo en esta línea celular se encuentra un aumento progresivo en el número de células que presentan antígenos virales. Al comparar las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i contra las células sin infectar se hallan valores de $P < 0.001$ que indican que existen diferencias significativas entre las medias de las diferentes h.p.i con respecto a la primera (Anexo 1).

Al evaluar si el virus que se adicionó a las células infecta, se replica y forma viriones, primero se infectó la línea celular con MOI de 2 y se cosechó a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. Dichas células se congelaron-descongelaron tres veces, se adicionó tripsina (1 mg/ml) durante 30 minutos y el lisado se adicionó a nuevas células para determinar su infectividad. Estas células se cosecharon a las 11 h.p.i y la infección se evaluó por inmunocitoquímica con anticuerpos policlonales contra proteínas estructurales del virus y no estructurales. Los resultados muestran que el aislamiento rotaviral WTEW genera partícula infecciosas tempranamente, desde las 4 h.p.i. (Figura 3 F).

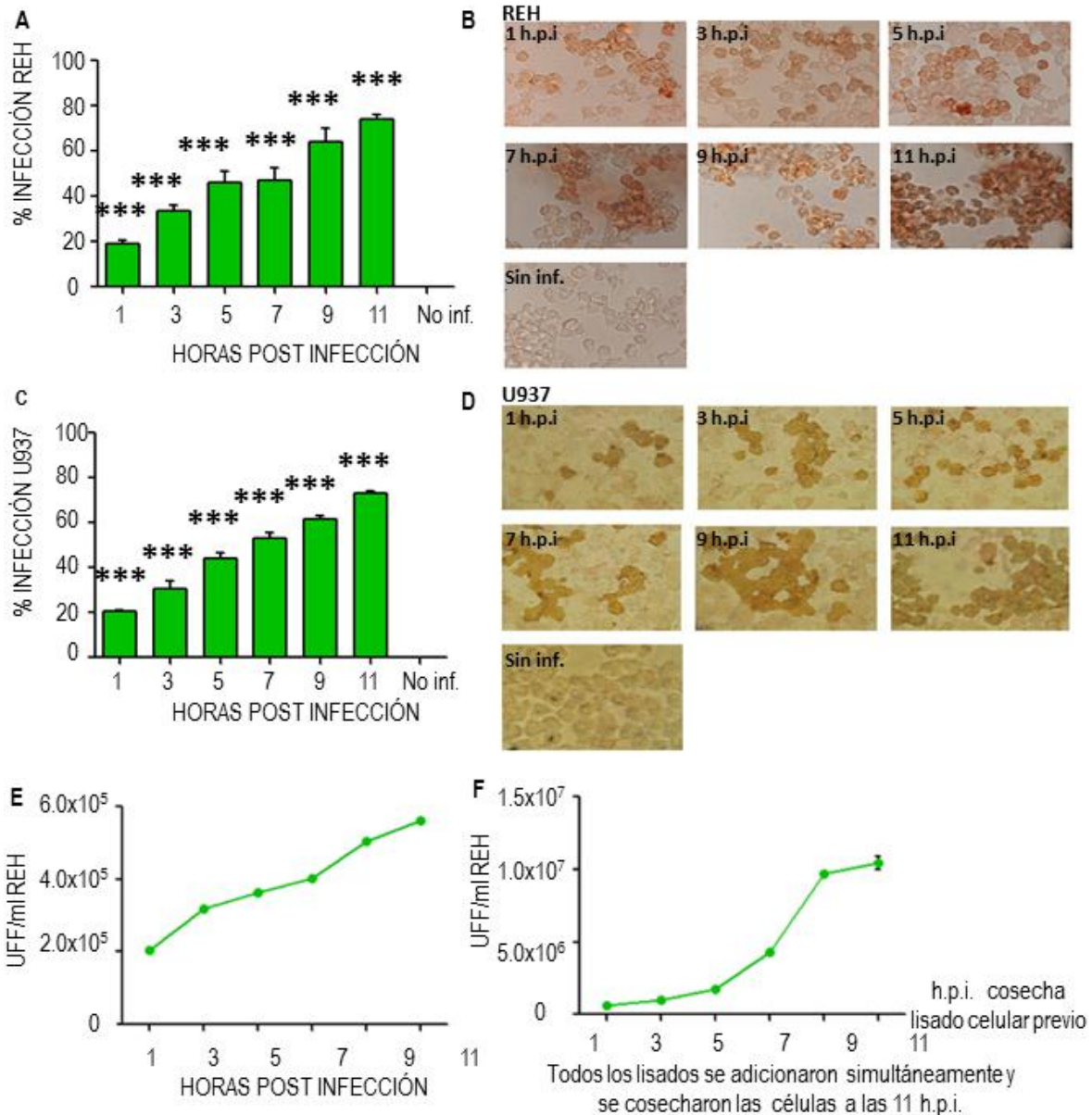


Figura 3. Rotavirus WTEW infecta células de líneas REH y U937. Células de las líneas U937 y REH fueron infectadas con rotavirus WTEW con un MOI 2, se colectaron las muestras a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i., como control se utilizaron células sin infectar. Se analizó la presencia de antígenos rotavirales usando anticuerpos contra proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus mediante inmunocitoquímica (coloración rojiza) (A, C) Conteo del porcentaje de infección de proteínas estructurales y no estructurales en células de las líneas (A) REH, (C) U937. (B, D) Inmunocitoquímica de las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. y de células sin infectar de las líneas (B) REH, (D) U937. (E) Se establecieron las UFF/ml en las células REH, para esto se recolectaron muestras con intervalos de 2 h hasta las 11 h.p.i. y se evaluó la presencia de antígenos rotavirales mediante inmunocitoquímica. (F) Las células fueron infectadas con un MOI de 2 del aislamiento WTEW, se recolectaron muestras con intervalos de 2 h hasta las 11 h.p.i. Las células infectadas obtenidas fueron congeladas-descongeladas tres veces, centrifugadas y el sobrenadante proveniente de este paso se activó con tripsina, adición a nuevas células, y se evaluó la presencia de antígenos rotavirales estructurales y no estructurales. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); * = P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

7.2. La infección por rotavirus produce alteración de la membrana citoplasmática después de 11 h.p.i, no genera permeabilidad de la membrana citoplasmática.

La inducción de la muerte celular durante el proceso de infección por virus es relevante para la liberación de la partícula viral y su diseminación. Por esto, evaluamos alteraciones en la membrana citoplasmática como la traslocación de la fosfatidil serina desde la cara interna hacia la cara externa de la membrana mediante el reactivo Anexina V. Para esto las células se infectaron con el aislamiento rotaviral WTEW con un MOI de 2, como control se utilizaron células sin infectar. Tanto células infectadas como no infectadas se recolectaron a las 0.25, 3, 7 y 11 h.p.i., se adicionó el reactivo Anexina V-Alexa 568 y se observó en el microscopio de fluorescencia. Los resultados obtenidos en los ensayos de Anexina V son el promedio de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 10 fotografías tomadas para cada una de las líneas celulares y para cada h.p.i., en células infectadas con rotavirus WTEW y no infectadas.

El porcentaje de fluorescencia como análisis cuantitativo en células REH, durante las 0.25, 3, 7 y 11 h.p.i., fueron del 0.6 %, 7.3%, 10.55% y 27.20% respectivamente (Figura 4-A). Al comparar con las células no infectadas, mostraron los siguientes valores de P: 3 h.p.i. $P = <0.0216$, 7 h.p.i. $P = <0.0498$, 11 h.p.i. $P = <0.0154$ que son considerados como diferencias significativas (Anexo 2). En la línea U937 el porcentaje de células positivas para Anexina V a las 0.25, 3, 7 y 11 h.p.i. fue del 6.0 %, 8.4%, 7.48% y 21.79% respectivamente (Figura 4-C). Al comparar con las células no infectadas mostró los siguientes valores de P: 0.25 h.p.i. $P = <0.9514$, 3 h.p.i. $P = <0.1552$, 7 h.p.i. $P = <0.3080$, 11 h.p.i. $P = <0.0007$. Esto indica que en las tres primeras horas evaluadas no existe una diferencia significativa con respecto a las células sin infectar, sin embargo a las 11 h.p.i. hay una diferencia altamente significativa (Anexo 2). Las fotografías representan lo encontrado en los porcentajes de células Anexina V positivas, en las células de las líneas REH y U937 (Figura 4-B, D).

Se evaluó si rotavirus afecta la permeabilidad de la membrana celular utilizando el reactivo 7AAD. Para esto las células se infectaron con el aislamiento de rotavirus WTEW (MOI de 2) y se utilizó como control células sin infectar. Tanto las células infectadas como las no infectadas se recolectaron a las 0.25, 3, 7 y 11 h.p.i., se adicionó el reactivo 7AAD sin fijar las células y se observó en el microscopio de fluorescencia. Los resultados y el análisis estadístico fueron realizados de igual manera que para Anexina V. El patrón de distribución del reactivo en las células tratadas con H_2O_2 fue considerado como positivo para 7AAD. En la línea REH los porcentajes de células positivas a las 0.25, 3, 7 y 11 h.p.i. fue de 1.85%, 8.05%, 10.05% y 17.25% respectivamente (Figura 4E), Al evaluar las diferencias con respecto a las células sin infectar se hallaron los siguientes valores P: 0.25 h.p.i. $P = <0.0565$, 3 h.p.i. $P = <0.0187$, 7 h.p.i. $P = <0.0316$ y 11 h.p.i. $P = <0.0708$ (Anexo 2). En el caso de las células U937 se encontraron porcentajes de 0.25 h.p.i. 3.18%, 3 h.p.i. 7.79%, 7 h.p.i. 18.68 y 11 h.p.i. 29.99% (Figura 4G). Al comparar con las células sin infectar en cada h.p.i. se observaron valores de $P > 0.05$ que indican no significancia (Anexo 2). Los resultados sugieren que durante las 11 h.p.i. no se presenta permeabilidad de la membrana celular.

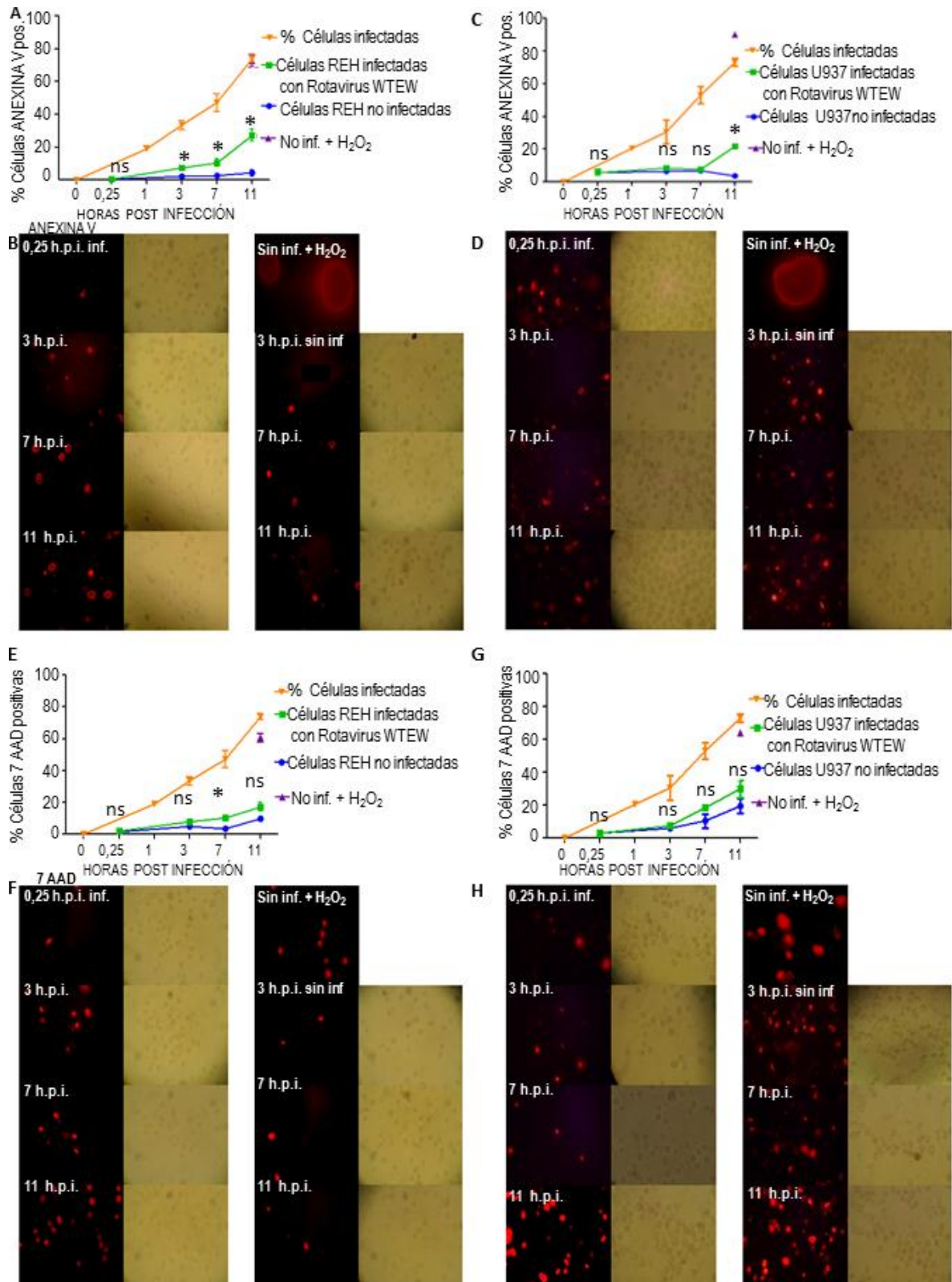


Figura 4. La infección por rotavirus induce alteración de la membrana citoplasmática después de 11 h.p.i. y no genera permeabilidad de la membrana citoplasmática. Las células fueron infectadas con un MOI de 2 de rotavirus WTEW,

como control se utilizaron células sin infectar en cada h.p.i., se colectaron las muestras a las 0.25, 3, 7 y 11 h.p.i y sin fijar se adiciono Anexina V (A, B, C, D) y 7AAD (E, F, G, H) y se evaluaron por microscopio de fluorescencia. (A, C) Conteo del porcentaje de células positivas para Anexina V en células de las líneas (A) REH, (C) U937. Fotografías representativas de cada h.p.i. en células infectadas, sin infectar y sin infectar y tratadas con H₂O₂ evaluadas con Anexina V en células de las líneas (B) REH, (C) U937. (E, G) Conteo del porcentaje de células positivas para 7AAD en células de las líneas (E) REH, (G) U937. Fotografías representativas de cada h.p.i. en células infectadas, sin infectar y sin infectar y tratadas con H₂O₂ evaluadas con 7AAD en células de las líneas (F) REH, (H) U937. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); * = P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

7.3. La infección por aislamiento de rotavirus WTEW en líneas celulares REH y U937 induce cambios en el patrón de distribución de la cromatina.

Para evaluar si la infección por rotavirus produce fragmentación nuclear y la condensación de la cromatina, las células se infectaron con el aislamiento rotaviral WTEW con un MOI de 2, como control se utilizaron células no tratadas o células tratadas con 1,0 mM/L de H₂O₂ durante 11 horas. Se cosechó a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i., se fijaron con formaldehído y se permeabilizaron con Triton X100, se adiciono el reactivo Hoescht 33342 (que se une selectivamente a regiones AT del DNA) o Ioduro de propidio (que se une a DNA o RNA) y se observó en el microscopio de fluorescencia. Los resultados obtenidos en los ensayos de Hoescht 33342 y el Ioduro de propidio son el promedio de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 10 fotografías tomadas para cada una de las líneas celulares y para cada h.p.i. evaluadas. En el análisis estadístico se compararon, el porcentaje de células con cambios en el patrón de distribución de la cromatina en células infectadas con rotavirus WTEW a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. y las no infectadas con el fin de hallar el nivel de significancia.

Se encontró que en células infectadas y evaluadas con Hoescht o Ioduro de propidio se presenta un patrón de fluorescencia similar al observado en células tratadas con H₂O₂. El análisis cuantitativo de células valoradas con Hoescht, mostró que las células REH presenta cambios en el patrón de distribución de la cromatina del 9.65 %, 29.15%, 40.45% 44.60%, 69.49% y 82.40% durante las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. respectivamente (Figura 5-A). Al comparar el porcentaje de la 1 h.p.i. con las células sin infectar se genera un valor de P= >0.05, indicando que no existen diferencias significativas entre las medias de ambos grupos. Al comparar las 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. contra las células sin infectar se obtienen valores de P= <0.001 que son considerados como diferencias significativas (Anexo 3). Al comparar la 3 h.p.i. contra la 1 h.p.i. se encuentra un valor de P <0,01 por lo cual se puede sugerir que a partir de la 3 h.p.i. la infección por rotavirus esta induciendo una fragmentación nuclear significativa (Anexo 3- b). En las células U937 evaluadas con Hoescht se halló 16.50 %, 33.55%, 50.10%, 67.60%, 78.95% y 84.80% a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. respectivamente (Figura 5-C), al comparar la 1 h.p.i. contra las células no infectadas se halló el valor de P= >0.05 que indica que no hay una diferencia significativa, al comparar las 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. contra las células sin infectar se obtuvo un valor de P= <0.001, que muestra que existen diferencias entre las medias altamente significativas (Anexo 3-a , Figura 5- B y 5- D). Al comparar la

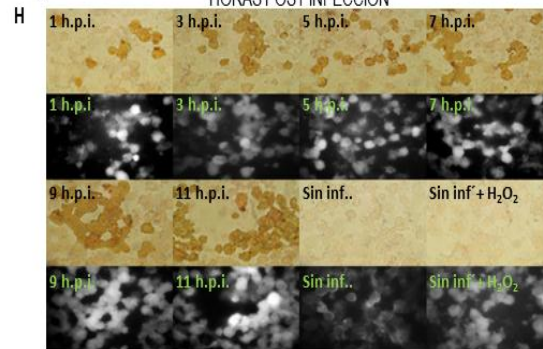
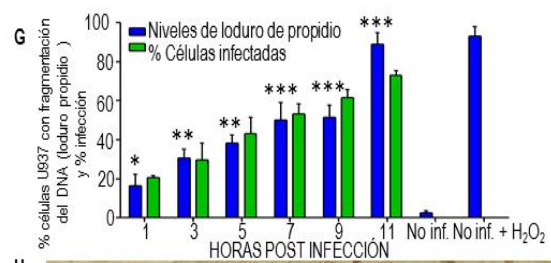
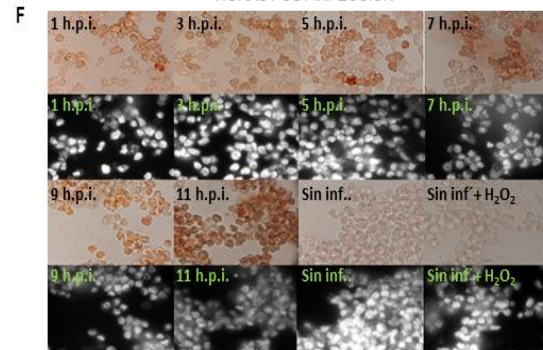
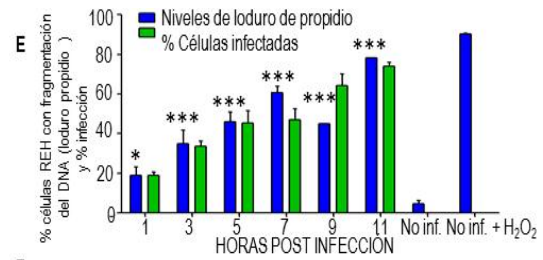
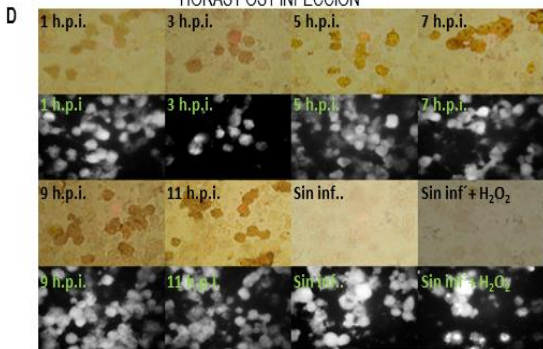
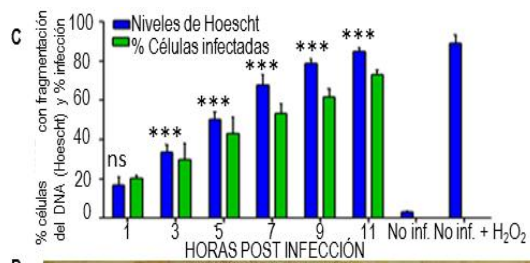
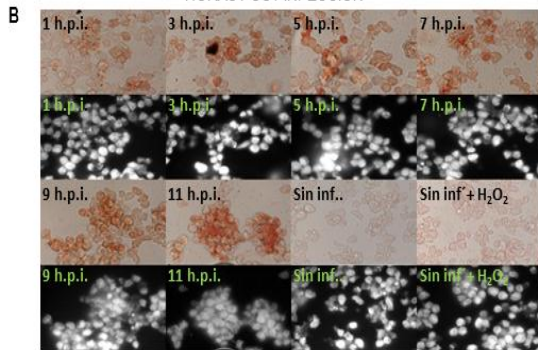
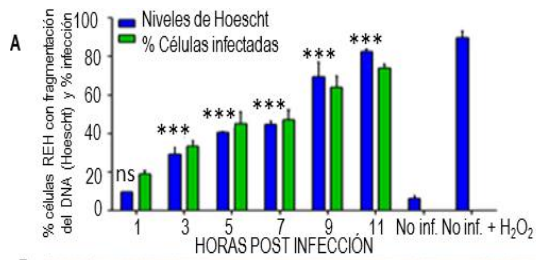
3 h.p.i. contra la 1 h.p.i. se halló un valor de $P < 0.05$, al igual que a las 5 h.p.i. contra la 3 y la 7 contra la 5 h.p.i. lo que indica que la infección por rotavirus induce en las células U937 cambios significativos en la fragmentación nuclear desde la 3 h.p.i. (Anexo 3- b) (Fotografías ampliadas Anexo 4a REH y 4b U937).

En las células REH evaluadas con yoduro de propidio a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. se presentaron los siguientes porcentajes: 18.80%, 35.00%, 46.05%, 60.80%, 44.85% y 88.20% respectivamente (Figura 5-E). Al comparar la 1 h.p.i. con las células sin infectar se obtuvo un valor de $P = < 0.05$ que indica una diferencia significativa entre las medias de los grupos cotejados. Cuando se compararon las 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. contra las células sin infectar se encontró valores de $P = < 0.001$ (Anexo 5).

En las células U937 se observaron los siguientes porcentajes en la 1 h.p.i. 16.50%, 3 h.p.i. 30.50%, 5 h.p.i. 38.20%, 7 h.p.i. 50.15%, 9 h.p.i. 51.51 y a las 11 h.p.i. 88.95% (Figura 5-G). Al comparar la 1 h.p.i. contra las células sin infectar no se hallaron diferencias significativas con un valor de $P = > 0.05$, al cotejar las 3 y 5 h.p.i. se halló un valor de $P < 0.01$, con las 7, 9 y 11 h.p.i. contra las células sin infectar se obtuvo un valor de $P < 0.001$, que indica que es una diferencia altamente significativa, (Anexo 5, Figura 5- F y 5- G). Al cotejar cada h.p.i. contra la anterior solo se hallan diferencias significativas en las 11 h.p.i. con respecto a las 9 h.p.i. lo cual podría sugerir que a pesar de que se pueden presentar cambios en el patrón de distribución de la cromatina significativos desde la 3 h.p.i. con respecto a las células sin infectar, el mayor cambio inducido por la infección por rotavirus ocurre desde las 11 h.p.i. (Anexo 5- b) (Fotografías ampliadas Anexo 6a REH y 6b U937).

Los resultados muestran que existe un incremento gradual desde la 3 h.p.i. aunque más desde la 5 h.p.i. hasta las 11 h.p.i. en de los niveles de células con cambio en el patrón de distribución de la cromatina evaluadas con Hoescht e yoduro de propidio en las líneas celulares REH y U937, lo que sugiere que se está induciendo una muerte celular posiblemente por apoptosis

Figura 5. La infección por rotavirus WTEW en líneas celulares REH y U937 induce cambios en el patrón de distribución de la cromatina. Las células fueron infectadas con un MOI de 2 de rotavirus WTEW, como control se utilizaron células sin infectar y células sin infectar expuestas a 1 mM de H_2O_2 durante 11 horas. Se colectaron las muestras a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i y los controles a las 11 h.p.i, se fijaron con formaldehído 4% y se permeabilizaron con Triton X100, se analizó la presencia de antígenos rotavirales usando anticuerpos contra proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus mediante inmunocitoquímica (coloración rojiza) y la condensación de la cromatina y fragmentación nuclear con los reactivos Hoescht (A, B, C, D) e yoduro de propidio (E, F, G, H). (A, C) Conteo del porcentaje de células con cambios en el patrón de distribución de la cromatina evaluada con Hoescht en células de las líneas (A) REH, (C) U937. (B, D) Fotografías representativas de cada h.p.i. en células infectadas con rotavirus WTEW y células sin infectar o sin infectar y expuestas a H_2O_2 , evaluadas con Hoescht y por inmunocitoquímica en células de las líneas (B) REH, (D) U937. (E, G) Conteo del porcentaje de células evaluadas con yoduro de propidio en las líneas celulares (E) REH, (G) U937. (F, H) Fotografías representativas de cada h.p.i. en células infectadas con rotavirus WTEW, células sin infectar o sin infectar y expuestas a H_2O_2 , evaluadas con yoduro de propidio y por inmunocitoquímica en células de las líneas (F) REH, (H) U937. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= $P > 0.05$ (no significativo); * = $P < 0.05$ (significativo); ** = $P < 0.01$ (muy significativo); *** = $P < 0.001$ (altamente significativo).



7.4. La infección por aislamiento de rotavirus WTEW induce rupturas en el DNA y activación de mecanismos de reparación del DNA

Al determinar que el rotavirus WTEW induce cambios en el patrón de distribución de la cromatina, una característica que es de carácter morfológico, es necesario examinar a través de un análisis bioquímico que si se estén generando rupturas en el DNA, por ejemplo, con el ensayo de TUNEL y de Poli – (ADP-Ribosa)-Polimerasa (PARP). Para esto las células REH y U937 se infectaron con WTEW a un MOI de 2, como controles se emplearon células no infectadas y células no infectadas y tratadas con 1 mM/L de H₂O₂ durante 11 horas. Se cosecharon a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i tanto células infectadas como no infectadas y luego el ensayo de TUNEL según especificaciones del kit *in situ* cell death (TUNEL, Roche) o de PARP (Roche) y se observó mediante epi-fluorescencia.

En células REH infectadas y cosechadas a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. se hallaron los siguientes porcentajes de células fluorescentes que indican positividad para TUNEL: 22.75%, 42.43%, 47.18%, 45.52%, 47.62% y 46.22% respectivamente (Figura 6 – A). Al comparar con las células sin infectar en cada h.p.i. se encontraron los siguientes valores de P: 1 h.p.i. P= 0.0443, 3 h.p.i. P= 0.0151, 5 h.p.i. P= 0.0087, 7 h.p.i. P= 0.0012, 9 h.p.i. P= 0.0411 y 11 h.p.i. P=0.0041 (Anexo 7). En células U937 infectadas con rotavirus se hallaron los porcentajes de 1 h.p.i. 16.58%, 3 h.p.i. 27.23%, 5 h.p.i. 35.92%, 7 h.p.i. 43.28%, 9 h.p.i. 52.11 y a las 11 h.p.i. 56.22% (Figura 6- D), al comparar contra las células sin infectar en cada h.p.i. se sacaron los valores de P: 1 h.p.i. P= 0.0016, 3 h.p.i. P= 0.0690, 5 h.p.i. P= 0.0117, 7 h.p.i. P= 0.0180, 9 h.p.i. P= 0.0042 y 11 h.p.i. P=<0.0001 (Anexo 7).

Estos resultados muestran que en ambas líneas celulares se presentan niveles de células positivas para TUNEL desde la 1 h.p.i., lo que se relaciona con los datos encontrados al evaluar fragmentación nuclear en los cuales se observa esta característica morfológica desde la 1 h.p.i. En las células REH existe un incremento en la 3 h.p.i. con respecto a la 1 pero en las 5, 7, 9 y 11 h.p.i. parecen que los niveles permanecen relativamente constantes, pero con relación a las células sin infectar si se observan cambios significativos en el porcentaje de células positivas. En el caso de las U937 aumentan gradualmente hasta las 11 h.p.i.. Se encuentra una correlación entre las células infectadas con rotavirus y las que son positivas para TUNEL en células de las líneas REH (Figura 6-C) y U937 (Figura 6- F). Los resultados muestran que se está presentando un incremento en las rupturas en el DNA sugiriendo que en ambas líneas celulares está relacionado con muerte celular por apoptosis.

Al analizar en las mismas muestras la fluorescencia total corregida (CTCF) para cada uno de las h.p.i. analizadas por medio del programa Image J, se observó que en las células REH en la 1 h.p.i. una fluorescencia de 25045,52 en la 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. 22258.86, 24779.98, 24379.95, 38215,60, 34080,09 respectivamente. Mientras en células sin infectar 11995.56, 25160.10, 21296.61, 24308.82, 23020.00 y 23786.65 a las 1, 3, 5, 9 y 11 h.p.i. respectivamente. (Figura 6- B). En las células U937 se obtuvieron fluorescencias de 1 h.p.i. 30491.10, 3 h.p.i. 41114.49, 5 h.p.i. 54009.91, 7 h.p.i. 61046.69, 9 h.p.i. 63518.83 y 11 h.p.i. 86333,31, en células sin infectar a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. se hallaron valores de 32764.42, 33625.57, 34053.32, 46006.63 y 59424.47 respectivamente.

Durante el proceso de muerte celular, cuando se produce fragmentación del DNA se induce la enzima PARP que reconoce específicamente cadenas de DNA con rupturas producidas por varios agentes genotóxicos permitiendo la reparación del DNA nuclear. Para evaluar si las células infectadas con rotavirus WTEW presentan rupturas del DNA y se están induciendo mecanismos de reparación de estos daños se analizó la presencia de esta proteína. Tanto las células infectadas como no infectadas se cosecharon a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i., se fijaron y se realizó la misma metodología descrita para inmunocitoquímica. Luego se adicionó Ac anti Poli – (ADP-Ribosa)-Polimerasa y posteriormente se adicionó un Ac policlonal IgG anti-conejo conjugado con FITC. La fluorescencia hallada en células tratadas con H₂O₂ fue similar a la encontrada en células infectadas con rotavirus e indico la presencia de la poli (ADP-ribosa) – polimerasa.

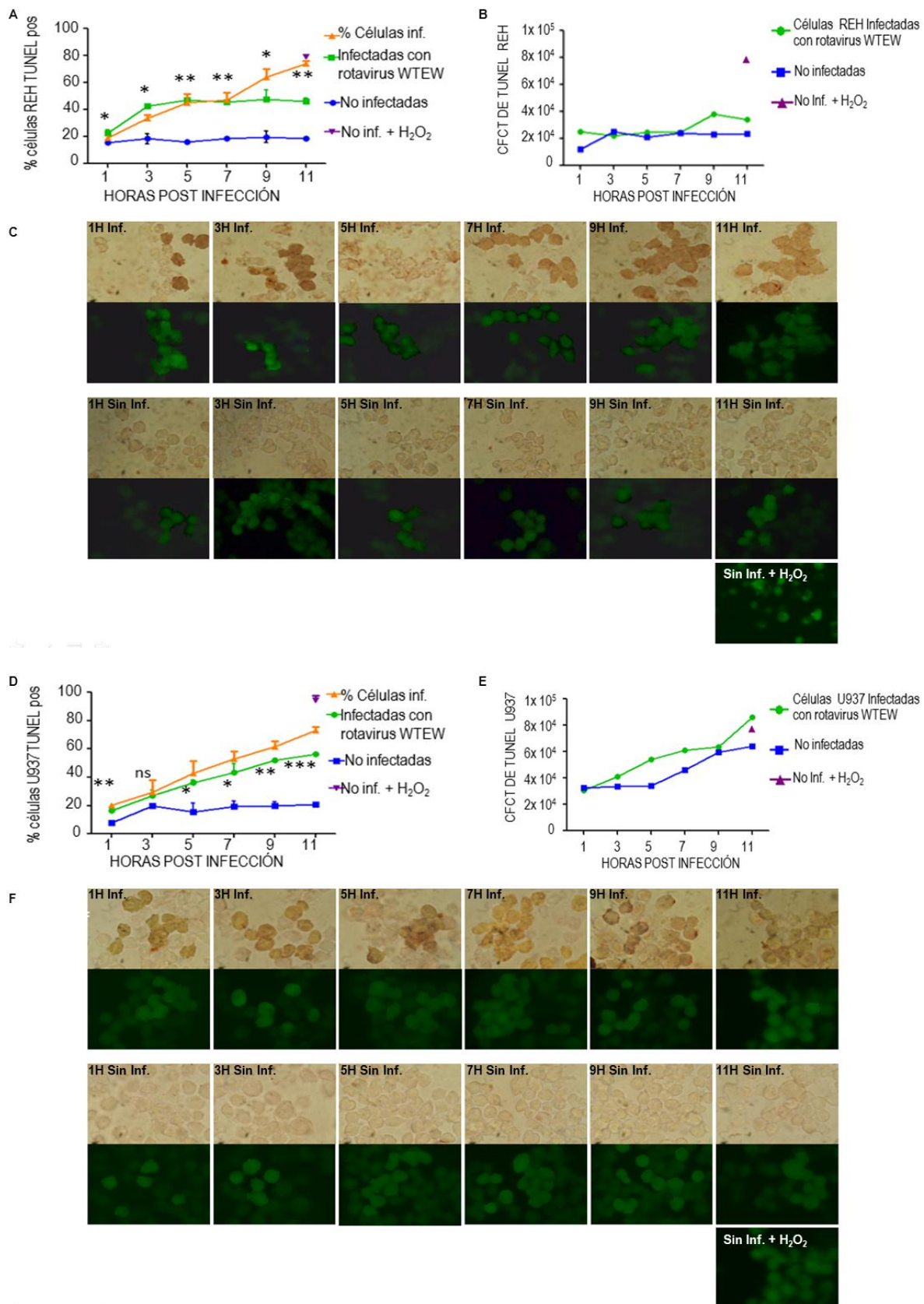
En las células REH infectadas a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. se halló los siguientes porcentajes: 27.44%, 35.13%, 40.33%, 44.48%, 49.32% y 57.78% respectivamente (Figura 6- G). Al comparar con células sin infectar se encontraron los valores de P: 1 h.p.i. P= 0.0946, 3 h.p.i. P= 0.0457, 5 h.p.i. P= 0.0154, 7 h.p.i. P= 0.502, 9 h.p.i. P= 0.0536 y 11 h.p.i. P=0.0030 (Anexo 8). En células U937 se obtuvo los porcentajes de 1 h.p.i. 27.95%, 3 h.p.i. 32.35%, 5 h.p.i. 37.07%, 7 h.p.i. 69.86%, 9 h.p.i. 58.26%, 11 h.p.i. 79.75% (Figura 6- J). Al cotejar con los niveles de PARP en células sin infectar se encontraron los valores de P: 1 h.p.i. P= 0.1811, 3 h.p.i. P= 0.0044, 5 h.p.i. P= 0.0192, 7 h.p.i. P= 0.0092, 9 h.p.i. P= 0.0037 y 11 h.p.i. P=0.0055 (Anexo 8).

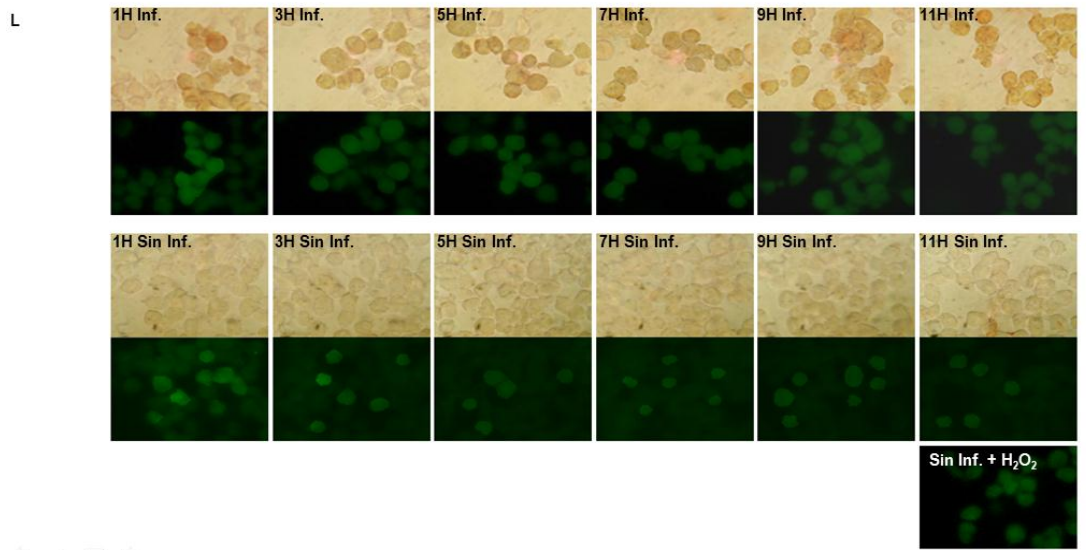
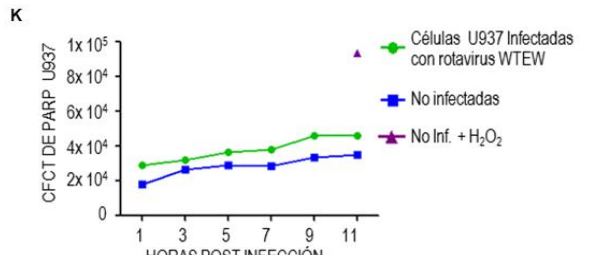
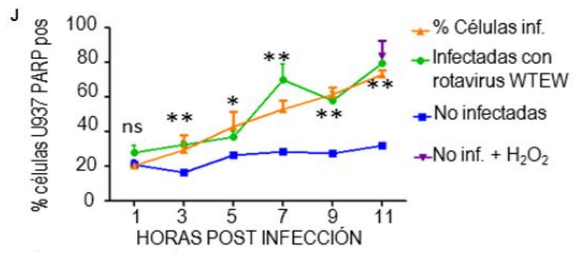
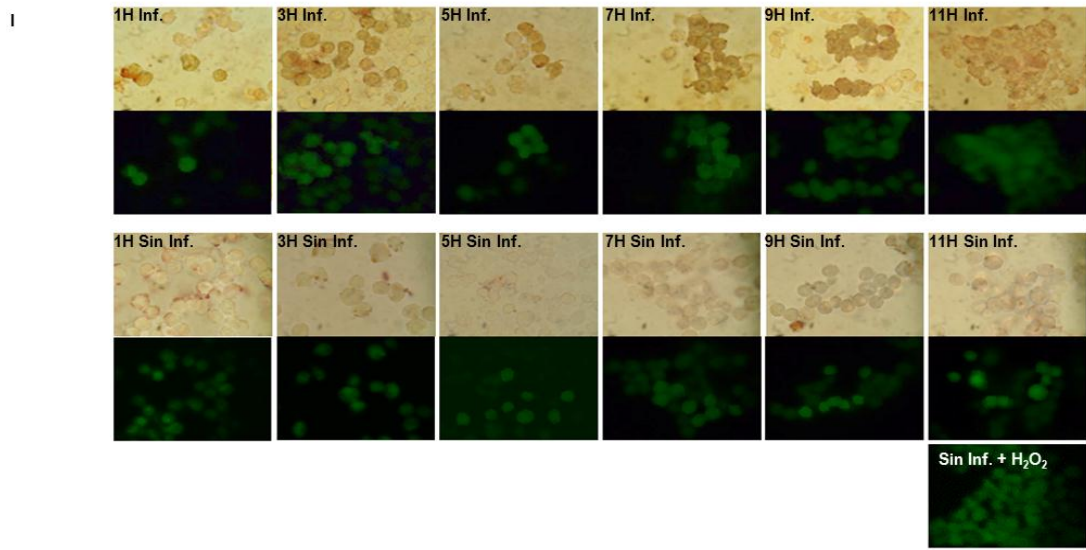
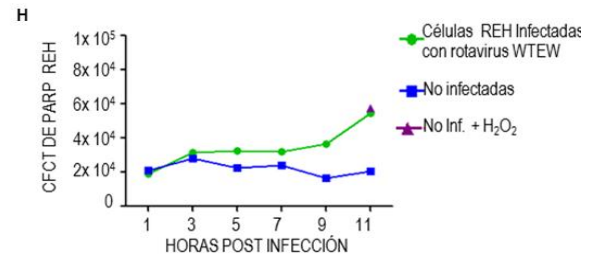
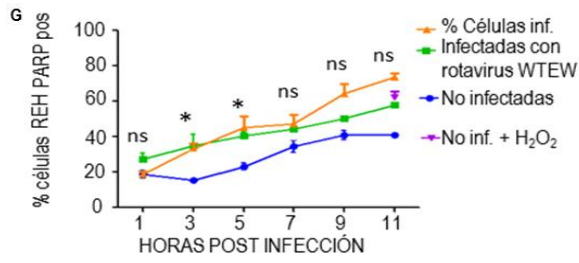
En las líneas REH y U937 se presentaron niveles relativamente altos de PARP en células sin infectar y REH a las 11 de cultivo mostró niveles del 51.62%. En células REH infectadas, con respecto a las células sin infectar, la diferencia significativa se observó a la 1, 3 y 11 h.p.i., mientras en las células U937 se obtiene diferencias significativas, con respecto a células sin infectar, desde la 3 h.p.i. e incrementa progresivamente hasta las 11 h.p.i.. Esto sugiere que las dos líneas tienen, en las condiciones de cultivo de nuestro laboratorio, cierta inestabilidad genómica, observada por el relativamente alto porcentaje de mecanismos de reparación evaluado como PARP. Sin embargo, el proceso infeccioso de rotavirus está aumentando las rupturas en el DNA y la célula incrementa la expresión de PARP para su reparación. El hecho que en células REH tengan altos porcentajes de células con PARP se relaciona con los bajos niveles de TUNEL encontrados en células infectadas con rotavirus WTEW durante las h.p.i. evaluadas, porque podría reparar las rupturas del DNA generadas en el transcurso de la infección por rotavirus WTEW. En el caso de las células U937 los niveles de PARP se incrementan gradualmente sugiriendo que es una respuesta para reparar las rupturas producidas durante la infección por rotavirus. Existe una correlación entre las células infectadas con rotavirus y las que son positivas para el anticuerpo anti-PARP en células de las líneas REH (Figura 6-I) y U937 (Figura 6- L).

Al analizar en las mismas muestras la fluorescencia total corregida (CTCF) para cada uno de las h.p.i. evaluadas por medio del programa Image J, se observó que en las células REH en la 1 h.p.i. una fluorescencia de 19086.68 en la 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. 31416.67, 32463.36, 32012.28, 36450.10 54598.89 respectivamente. Mientras en células sin infectar 2129.23, 28231.16, 22439.98, 23848.87, 16779.98 y 20694.42 a las 1, 3, 5, 9 y 11 h.p.i. respectivamente (Figura 6- H). En las células U937 se obtuvieron fluorescencias de 1 h.p.i. 28896.66, 3 h.p.i. 32297,98 h.p.i. 36574.50, 7

h.p.i. 37966.38, 9 h.p.i. 45988.82 y 11 h.p.i. 45932,28, en células sin infectar a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. se hallaron valores de 17947.79, 26528.89, 29075.54, 28341.18, 33365.50 y 34913.34 respectivamente (Figura 6- K).

Figura 6. La infección por rotavirus WTEW induce rupturas en el DNA y activación de mecanismos de reparación del DNA. Las células fueron infectadas con un MOI de 2 de rotavirus WTEW, como control se utilizaron células sin infectar en cada h.p.i. y células sin infectar expuestas a 1 mM de H₂O₂ durante 11 horas. Se colectaron las muestras y las células sin infectar a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. y las expuestas a H₂O₂ a las 11 h.p.i, se analizó la presencia de antígenos rotavirales usando anticuerpos contra proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus mediante inmunocitoquímica (coloración rojiza) y se evaluó la incorporación de oligonucleótidos marcados con fluoresceína mediante el método de TUNEL (verde) **(A, C, D, F)** o la presencia de la enzima Poli ADP Ribosa Polimerasa (PARP) que participa la reparación del DNA **(E, I, J, L)**. **(A, D)** Conteo del porcentaje de células con fluorescentes positivas para la reacción de TUNEL en las líneas celulares **(A)** REH, **(D)** U937. **(C, F)** Fotografías representativas de cada h.p.i. en células infectadas con rotavirus WTEW y células sin infectar o sin infectar y expuestas a H₂O₂, evaluadas con reacción de TUNEL y por inmunocitoquímica en células de las líneas **(C)** REH, **(F)** U937. **(B, E)** Calculo de la fluorescencia total corregida (CTCF) por medio del programa ImageJ en células de las líneas **(B)** REH, **(E)** U937. **(G, J)** Conteo del porcentaje de células evaluadas con PARP en las líneas celulares **(G)** REH, **(J)** U937. **(I, L)** Fotografías representativas de cada h.p.i. en células infectadas con rotavirus WTEW y células sin infectar o sin infectar y expuestas a H₂O₂, evaluadas para la presencia de la PARP y por inmunocitoquímica en células de las líneas **(I)** REH, **(L)** U937. **(H, K)** Calculo de la fluorescencia total corregida (CTCF) por medio del programa ImageJ en células de las líneas **(H)** REH, **(K)** U937. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); * = P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P<0.001 (altamente significativo).





7.5. La infección por aislamiento de rotavirus WTEW induce pérdida de potencial de membrana mitocondrial y causa cambios en actividad metabólica celular dependiente del MOI

Al hallar que la infección por rotavirus WTEW induce marcadores de muerte celular tales como exposición de fosfatidilserina a las 11 h.p.i., rupturas del DNA e inducción de mecanismos de reparación (PARP), es necesario evaluar si la mitocondria se encuentra relacionada con la muerte celular provocada por rotavirus. Se ha reportado que la enterotoxina NSP4 de rotavirus, es una viroporina que desestabiliza membranas y también que puede causar perturbación en la mitocondria. Para evaluar esto se utilizó el método de DiOC6 un marcador lipofílico verde fluorescente que se acumula específicamente en mitocondrias de células normales. Las células REH y U937 fueron infectadas con rotavirus WTEW con un MOI de 2, como control se utilizaron células no tratadas y células tratadas con 1,0 mM/L de H₂O₂ durante 11 horas. Tanto las células infectadas como no infectadas se recolectaron a las 0, 3, 7 y 11 h.p.i., se les adiciono DiOC6 (3) por 15 min y se observó en el microscopio de fluorescencia.

En células REH se encuentra que el número de células positivas para DiOC6 durante las 0.25, 3, 7 y 11 h.p.i., fueron del 98.70%, 85.6%, 82.05% y 70.55% respectivamente (Figura 7- A). Al comparar con las células no infectadas, mostraron los siguientes valores de P: 0.25 h.p.i P= 1.000, 3 h.p.i. P= 0.0081, 7 h.p.i. P= 0.6579, 11 h.p.i. P= 0.0481 presentándose solo diferencias significativas a las 3 y 11 h.p.i. (Anexo 9). En las células U937 positivas para DiOC6 a las 0.25, 3, 7 y 11 h.p.i. fueron del 94.05 %, 89.55%, 64.35% y 41.05% (Figura 7- B) cuando se compararon con las células no infectadas mostraron los siguientes valores de P: 0.25 h.p.i. P= 1.000, 3 h.p.i. P= 0.0475, 7 h.p.i. P= 0.2093, 11 h.p.i. P= 0.0581 (Anexo 9). Al analizar la fluorescencia por medio de CFCT se encuentra una tendencia similar a lo hallado con los porcentajes de células positivas para DiOC6 en ambas líneas celulares (Figura 7C REH, Figura 7D U937).

Se evaluó la actividad metabólica mediante la técnica de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Para esto las células de las líneas REH y U937 se infectaron con rotavirus WTEW con un MOI de 2, a las 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i se les adiciono el MTT, se incubo, luego se solubilizaron los cristales de cada muestra para posteriormente leer la absorbancia. Como control se utilizaron células sin infectar recolectadas a iguales horas que células infectadas y células sin infectar tratadas con 1,0 mM/L de H₂O₂ durante 11 h. Para el análisis se realizó el cálculo de supervivencia: media de valores de densidad óptica de células infectadas o tratadas con H₂O₂ / media de valores de densidad óptica de células sin infectar.

En células REH los porcentajes de supervivencia que se obtuvieron a las 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. fueron 77.50%, 68.03%, 74.54%, 68.11% y 71.22% respectivamente, mientras las células tratadas con H₂O₂ se encontró un porcentaje del 46.96% (Figura 7- G). Al comparar la 3 h.p.i. con las células sin infectar y tratadas con H₂O₂ se obtuvo el valor de P<0.001, al comparar las 5, 7 y 9 h.p.i. con las células sin infectar y tratadas con H₂O₂ se obtuvieron valores de P >0.01 (Anexo 10). En las células U937 se encontraron los porcentajes de supervivencia: 3 h.p.i. 71.66%, 5 h.p.i. 70.12%, 7 h.p.i.

68.87%, 9 h.p.i. 78.17% y 11 h.p.i. 51.50% (Figura 7- H). Al comparar las células sin infectar y tratadas con H_2O_2 con la 3 h.p.i. se obtuvo el valor de $P < 0.001$. Al comparar las 5, 7 y 9 h.p.i. se obtuvo valores de $P > 0.01$ (Anexo 10).

Los resultados muestran que la infección por rotavirus en células REH no induce cambios significativos en la actividad metabólica durante 11 h.p.i. si se compara cada h.p.i. con respecto a la anterior (Anexo 10b). Sin embargo, las células U937 muestran una disminución en la actividad metabólica llegando a un porcentaje de supervivencia de 51.5% a las 11 h.p.i. ($P < 0.01$). Esto sugiere que el proceso infeccioso de rotavirus no altera la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial en la línea REH y parcialmente en U937, durante las h.p.i. estudiadas.

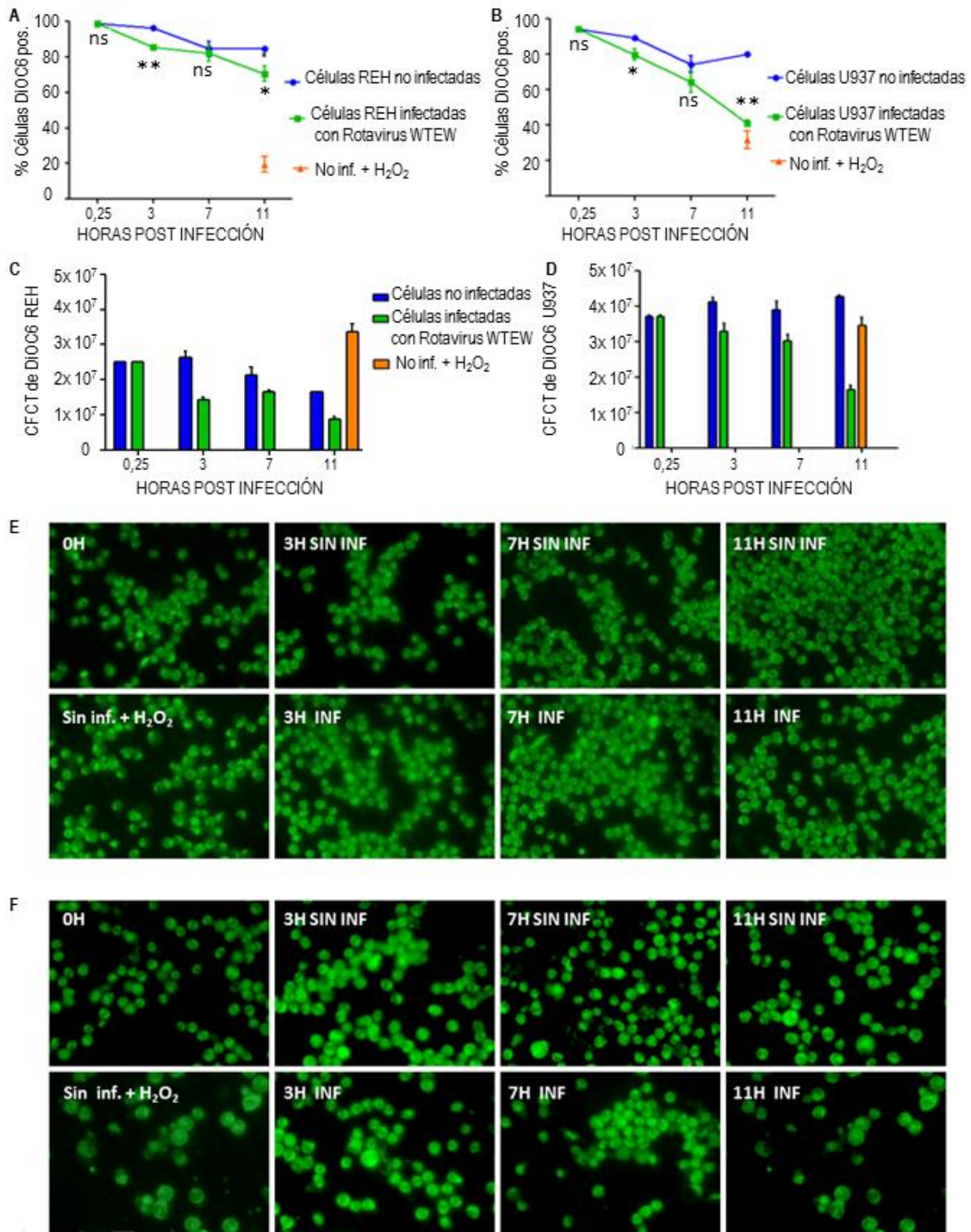
Otro método utilizado para evaluar la actividad metabólica es la técnica de la resazurina que es un marcador no fluorescente azul que es reducido a resofurina rosada y altamente fluorescente por oxidoreductasas que se encuentran fundamentalmente en mitocondria de células vivas. Para esto células de las líneas REH y U937 fueron infectadas con rotavirus WTEW con un MOI de 2, luego de cumplidas las 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. se les adiciono solución de resazurina, se incubaron por 2h y fueron leídas sus absorbancias e interpretada como porcentaje de supervivencia. Como control se utilizaron células sin infectar recolectadas a iguales horas que células infectadas y células sin infectar tratadas con 1,0 mM/L de H_2O_2 durante 11h. El cálculo de células viables se hizo utilizando la fórmula de % de supervivencia: media de valores de densidad óptica de células infectadas o tratadas con H_2O_2 / media de valores de densidad óptica de células sin infectar.

Se observó que en las células REH los porcentajes de supervivencia que se hallaron a las 3, 5, 7, 9, 11 y 27 h.p.i. fueron del 95.06%, 89.77%, 88.96%, 72.41%, 76.14% y 86.14% respectivamente, mientras las células tratadas con H_2O_2 se encontró un porcentaje del 44.12% (Figura 7- I). Al comparar las células tratadas con H_2O_2 con la 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. se halló valores de $P < 0.001$ en todos los casos (Anexo 11). En las células U937 se encontraron los porcentajes de supervivencia: 3 h.p.i. 91.94%, 5 h.p.i. 87.65%, 7 h.p.i. 96.27%, 9 h.p.i. 68.74%, 11 h.p.i. 70.96% y 27 h.p.i. 94.18% (Figura 7- J). Al comparar las células tratadas con H_2O_2 con las 3 y 5 h.p.i. se halló valores de $P < 0.01$, al cotejar la 7 y 27 h.p.i. se obtuvieron los valores de $P > 0.001$ y al comparar con 9 h.p.i. y 11 h.p.i. $P > 0.05$ (Anexo 11). Estos resultados similares a los encontrados con el método de MTT, y se podría sugerir de nuevo que rotavirus no interfiere, para cumplir su ciclo replicativo, con la actividad de las enzimas analizadas.

Luego se evaluó si los porcentajes de supervivencia, hallados con el método de oxidación de la resazurina, varían según el MOI con el cual las células son infectadas (Fig. 7 K, L). Para esto, se realizaron las infecciones de ambas líneas celulares con los MOI 2, 4 y 10 a las 7 y 11 h.p.i.. En células REH con MOI de 10 se obtuvo porcentajes de supervivencia a las 7 h.p.i. de 79.16%, 85.94% con MOI de 4 y 88.96% con de MOI 2 (Figura 7- K), al comparar los MOI 10 y 4 contra el MOI de 2 se obtienen los valores de $P > 0.05$ que indican diferencia no significativa (Anexo 12). Al evaluar las 11 h.p.i. con un MOI de 10 se encontró porcentajes de supervivencia 44.12%, 58.17% con MOI 4 y 76.14% con MOI 2 (Figura 7- K). Al comparar los MOI 10 y 4 contra el MOI de 2 se

obtienen los valores de P: MOI 10 $P = <0.01$ y MOI 4 $P = <0.05$ (Anexo 12). En células U937 con MOI 10 se encontró porcentajes de supervivencia a las 7 h.p.i. 57.72%, 61.28% con MOI 4 y 96.27% con MOI 2 (Figura 7- L). Al comparar los MOI 10 y 4 contra el MOI de 2 se obtienen los valores de $P = >0.01$ que indica diferencia muy significativa (Anexo 12). Al valorar las 11 h.p.i. con MOI 10 se halló los siguientes porcentajes de supervivencia 45.11%, 49.52% con MOI 4 y 70.96% con MOI 2 (Figura 7- L). Al comparar los MOI 10 y 4 contra el MOI de 2 se obtienen los valores de P: MOI 10 $P = <0.05$ y MOI 4 $P = <0.05$ (Anexo 12).

Los resultados muestran que en células de la línea REH a las 7 h.p.i. no existen cambios significativos en los porcentajes de supervivencia con los diferentes MOI del virus, pero si se presenta disminución en los porcentajes con diferencias significativas en las 11 h.p.i.. En las células U937 se observa que existen diferencias significativas en las 7 y 11 h.p.i. al infectar con las diferentes MOI, de nuevo se encuentra que entre más partículas virales se adicionen a las células, menor es el porcentaje de supervivencia. Estos resultados sugieren que el número de partículas que ingresan a la célula afecta en forma directamente proporcional la actividad metabólica general de la célula, probablemente por competencia entre las proteínas virales y celulares.



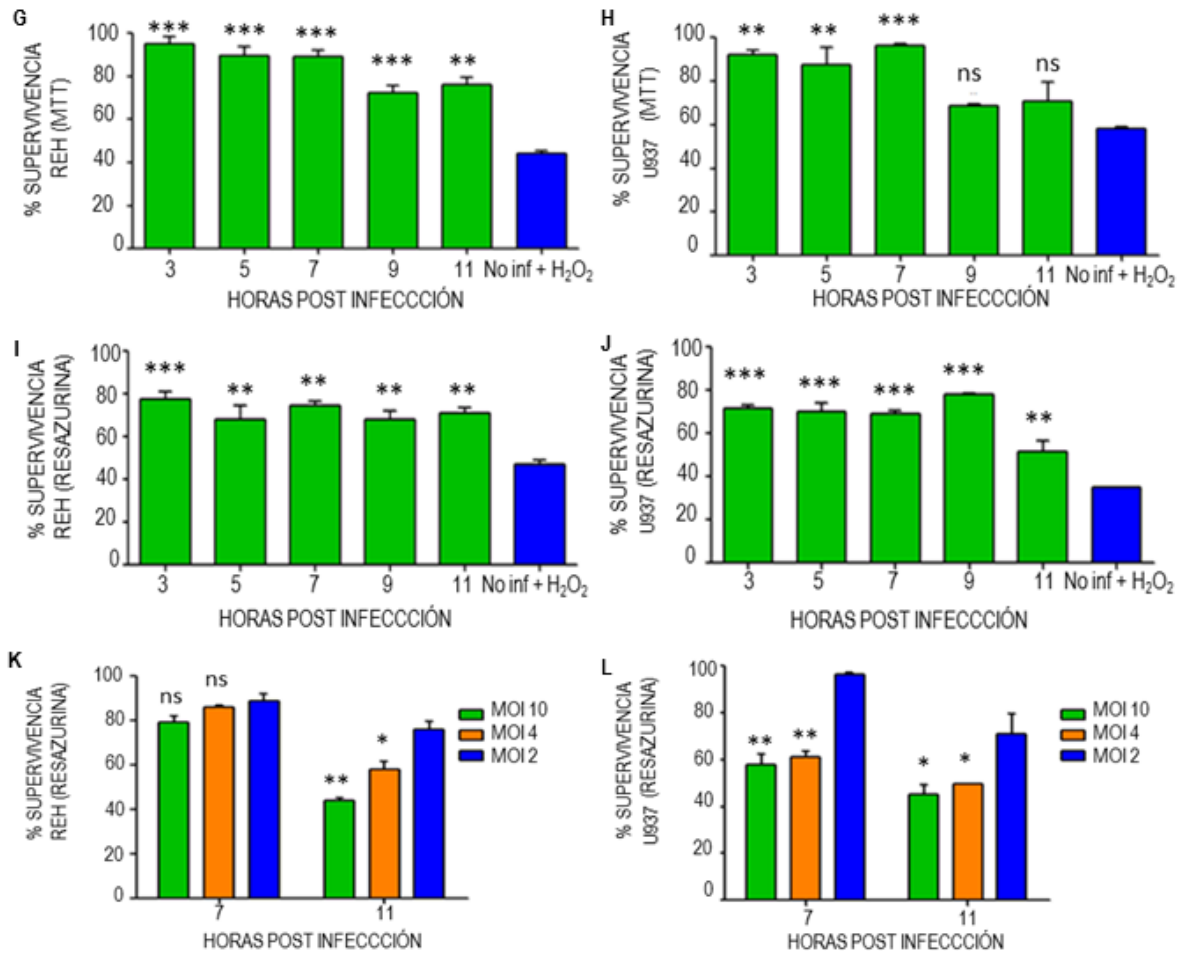


Figura 7. La infección por rotavirus WTEW induce pérdida de potencial de membrana mitocondrial y causa cambios en actividad metabólica celular dependiente del MOI. (A, B, C, D, E, F) Las células fueron infectadas con un MOI de 2 de rotavirus WTEW, como control se utilizaron células sin infectar en cada h.p.i., se colectaron las muestras a las 0.25, 3, 7 y 11 h.p.i y sin fijar se adicionó el DiOC6. **(A, C)** Conteo del porcentaje de células positivas para DiOC6 en células de las líneas **(A)** REH, **(B)** U937. **(C, D)** Cálculo de la fluorescencia total corregida (CTCF) por medio del programa ImageJ en células de las líneas **(C)** REH, **(D)** U937. **(E, F)** Fotografías representativas de cada h.p.i. en células infectadas y sin infectar evaluadas con DiOC6 en células de las líneas **(E)** REH, **(F)** U937. **(G, H, I, J, K, L)** Las células fueron infectadas con rotavirus WTEW con un MOI de 2, como control se utilizaron células sin infectar expuestas a 1 mM de H₂O₂ durante 11 horas. A las 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i tanto a células infectadas como sin infectar se les adiciono Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) **(G, H)** o Resazurina **(I, J)**, se incubaron por 2h. Posterior a la incubación a las células evaluadas con resazurina se les mide la absorbancia y las muestras tratadas con MTT se les solubilizan los cristales de formazan, para luego ser leídas sus absorbancia. **(G, H)** Porcentajes de supervivencia medido por MTT en células de las líneas **(G)** REH y **(H)** U937. **(I, J)** Porcentajes de supervivencia medidos por Resazurina en células de las líneas **(I)** REH y **(J)** U937. **(K, L)** Con el fin de evaluar si los porcentajes de supervivencia dependen del MOI con que son infectadas las células, se realiza la infección con MOI virus 10, 4 y 2 en las células de las líneas **(K)** REH y **(L)** U937. Para el análisis se realizó el cálculo de supervivencia: media de valores de densidad óptica de células infectadas o tratadas con H₂O₂ / media de valores de densidad óptica de células sin infectar. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

7.6. La infección por rotavirus WTEW, en células de las líneas REH y U937, induce incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS, EROs) y se reducen al tratar con inhibidores de la vía NFκB.

Un estudio anterior de nuestro laboratorio ha encontrado que en enterocitos de ratón infectados con el rotavirus ECwt se produce incremento de ROS [220], y se sabe que los ROS están implicados en muerte celular. Por esto, se quiere identificar si este fenómeno se presenta en líneas celulares U937 y REH infectadas con rotavirus WTEW. Para evaluar los niveles de ROS se utilizó el kit Cellomics® Oxidative Stress I que tiene como principio que en presencia de ROS el dihydroethidium no fluorescente se convierte en ethidium altamente fluorescente que posteriormente se une al DNA. Las células fueron infectadas con rotavirus WTEW con MOI de 2, como control se utilizaron células no tratadas. A las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. se adiciono dihydroethidium, luego se cosecharon y se realizó el procedimiento para ser leídas en el microscopio de fluorescencia. Los resultados obtenidos en los ensayos de DHE son el promedio de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 10 fotografías tomadas para cada una de las líneas celulares y para cada h.p.i. evaluadas. En el análisis estadístico se compararon, el porcentaje de células positivas para ROS en células infectadas con rotavirus WTEW y las no infectadas para cada h.p.i. con el fin de hallar el nivel de significancia

En células REH se encontró que los porcentajes de células positivas para ROS en las células infectadas durante las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. fueron: 34.94%, 30.775%, 33.23%, 41.20%, 49.69% y 43.16% respectivamente (Figura 8- A). Al comparar con células sin infectar se encontraron los valores de P: 1 h.p.i. P= 0.0425, 3 h.p.i. P= 0.1260, 5 h.p.i. P= 0.0142, 7 h.p.i. P= 0.0071, 9 h.p.i. P= 0.0183 y 11 h.p.i. P=0.0130 (Anexo 13). En células U937 se obtuvieron los porcentajes de 1 h.p.i. 45.51%, 3 h.p.i. 46.19%, 5 h.p.i. 59.37%, 7 h.p.i. 57.12%, 9 h.p.i. 68.45%, 11 h.p.i. 44.1% (Figura 8- C). Al cotejar con los niveles de ROS en células sin infectar se encontraron los valores de P: 1 h.p.i. P= 0.0066, 3 h.p.i. P= 0,0941, 5 h.p.i. P= 0.0101, 7 h.p.i. P= 0.0264, 9 h.p.i. P= 0.0102 y 11 h.p.i. P=0.0105 (Anexo 13). En las fotografías se observa las células positivas para ROS en las líneas REH (Figura 8- B) y U937 (Figura 8- D) infectadas y no infectadas a las diferentes h.p.i.. Al observar en ambas líneas celulares la fluorescencia obtenida con CFCT se encuentra que en general se presentan niveles más altos en células infectadas comparado con las células sin infectar y se correlaciona con los resultados obtenidos al evaluar el porcentaje de células positivas para ROS (Figura 8E REH y Figura 8F U937).

Los resultados muestran que en células de las líneas REH y U937 infectadas con rotavirus WTEW durante las diferentes h.p.i. se incrementan los niveles de ROS con relación a las células sin infectar y se hace significativo a partir de las 5 h.p.i. en ambas líneas celulares. En general, el número de células en las que se detectó antígenos rotavirales fue mayor respecto a las que expresan ROS.

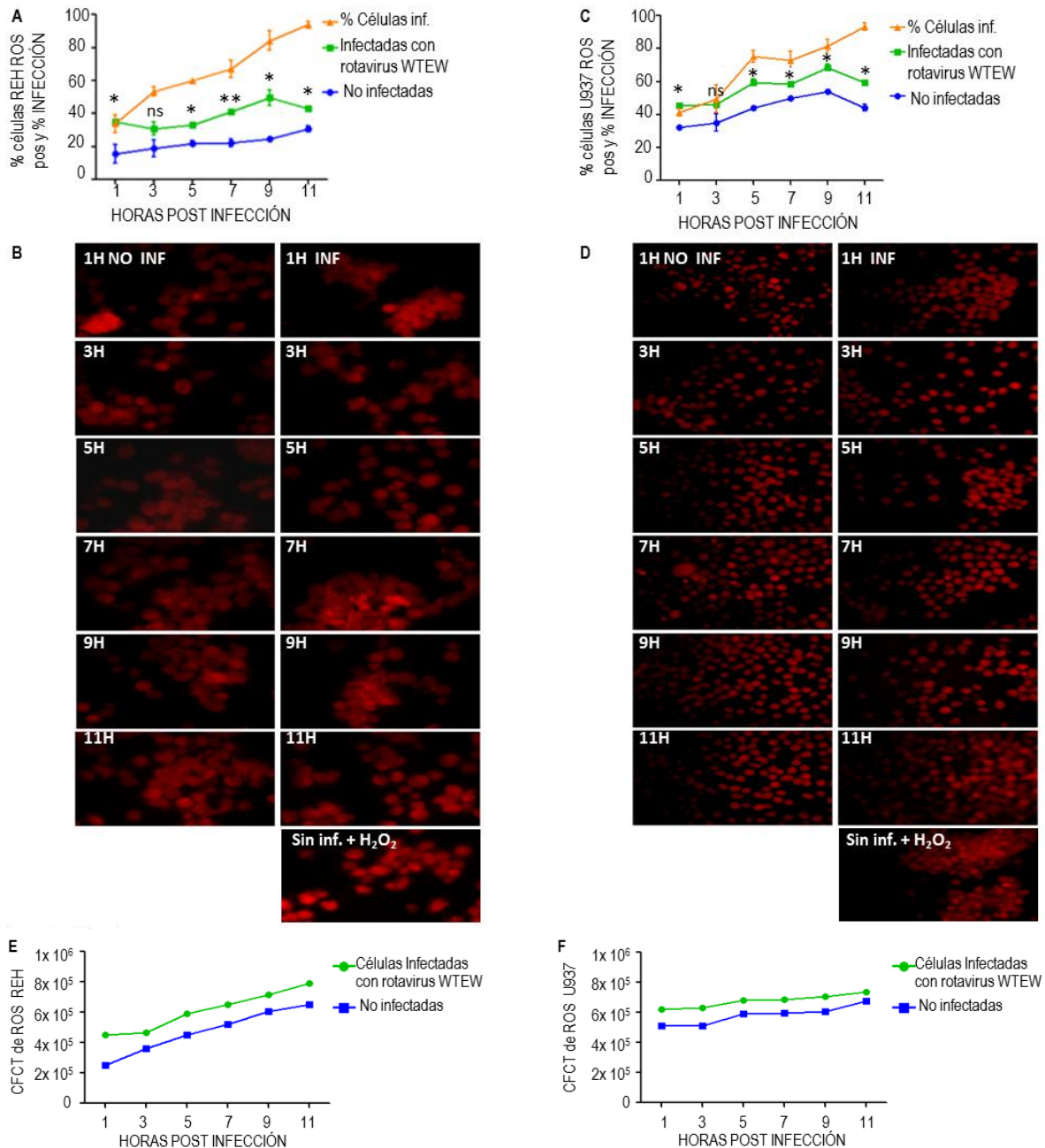


Figura 8. La infección por rotavirus WTEW induce la producción de especies reactivas de oxígeno. Las células fueron infectadas con un MOI de 2 de rotavirus WTEW, como control se utilizaron células sin infectar en cada h.p.i. y células sin infectar expuestas a 1 mM de H₂O₂ durante 11 horas. Se colectaron las muestras y las células sin infectar a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i. y las expuestas a H₂O₂ a las 11 h.p.i., se analizó la presencia de ROS usando el kit Cellomics® Oxidative Stress I si hay ROS presente en las células oxida el dihidroetidio (DHE) y lo convierte etidio que se intercala en el DNA, generando fluorescencia (roja). **(A, B)** Conteo del porcentaje de células positivas para ROS en células de las líneas **(A)** REH, **(B)** U937. **(B, D)** Fotografías representativas de cada h.p.i. en células infectadas con rotavirus WTEW y células sin infectar o sin infectar y expuestas a H₂O₂, evaluadas con DHE en células de las líneas **(B)** REH, **(D)** U937. **(E, F)** Cálculo de la fluorescencia total corregida (CTCF) por medio del programa ImageJ en células de las líneas **(E)** REH, **(F)** U937. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por

*duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= $P>0.05$ (no significativo); *= $P<0.05$ (significativo); ** = $P<0.01$ (muy significativo); *** = $P<0.001$ (altamente significativo).*

Dado que la infección por rotavirus WTEW induce incremento en los niveles de ROS, evaluamos que ocurre con el proceso infeccioso de rotavirus y los niveles de ROS cuando se neutralizan los ROS con NAC o se utilizan inhibidores de la vía NF- κ B. Para esto, las células se sembraron en cajas de 96 pozos se infectaron con rotavirus WTEW con un MOI de 2, se trataron con NAC 30 μ M e inhibidores de la vía NF- κ B: tiazonilediona 3.3 mM, pioglitazona 0.15 mM, rosiglitazona 3.3 mM, y curcumina 30 μ M (concentraciones establecidas previamente en nuestro laboratorio), a las 9 h.p.i. tanto a células infectadas como no infectadas se les adicionó dihydroethidium, se incubó por 30 min, luego se tomaron las células y se realizó proceso de medición de ROS con DHE como se describió anteriormente. A parte con los remanentes se realizó proceso de inmunocitoquímica con el fin de evaluar niveles de infección.

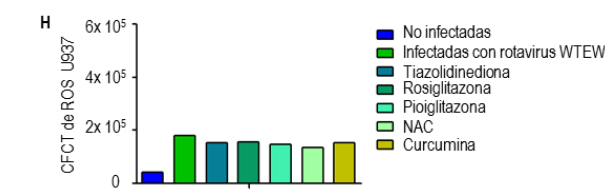
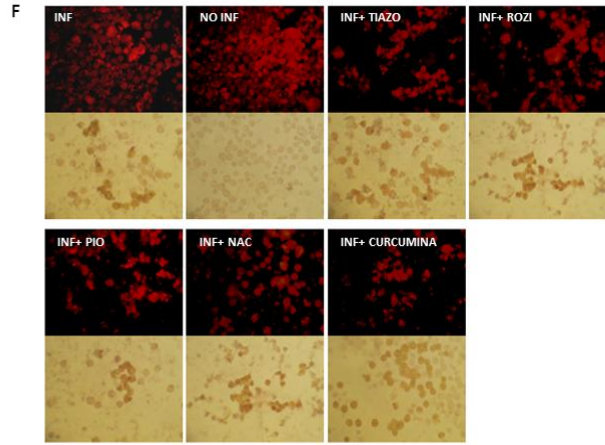
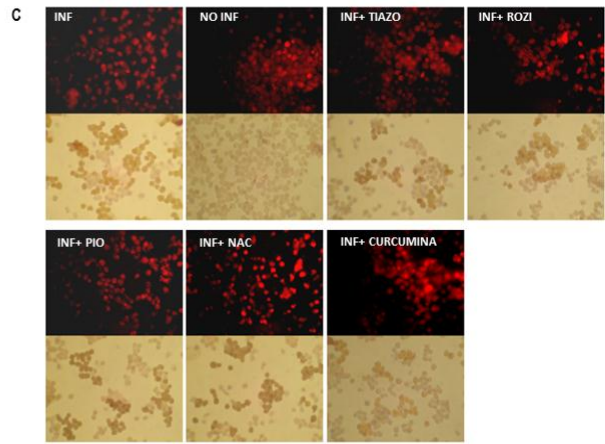
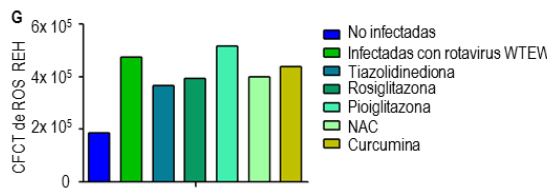
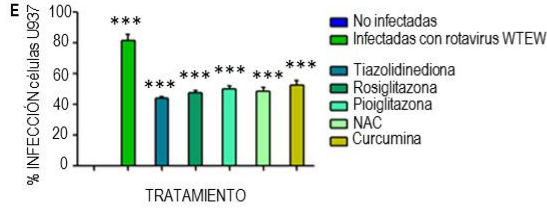
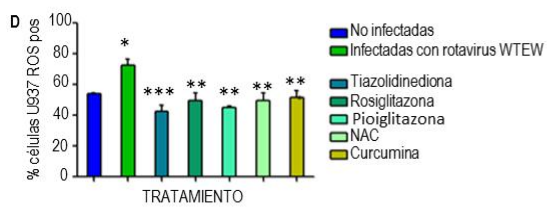
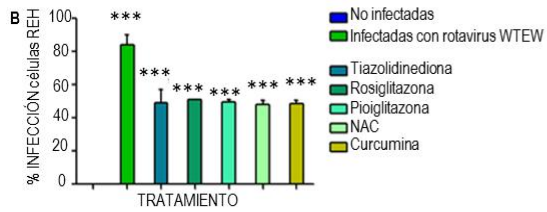
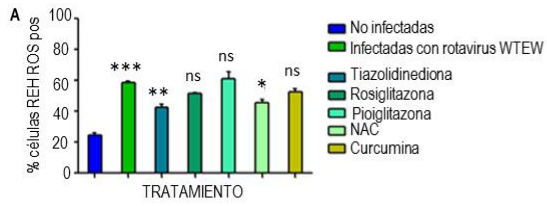
En células REH el porcentaje de células positivas para ROS en las células infectadas y tratadas con tiazonilediona, rosiglitazona, pioglitazona, curcumina y NAC fue de: 42.35%, 51.54%, 60.92%, 52.45% y 45.39% respectivamente (Figura 9- A), mientras en las células infectadas sin tratamiento el porcentaje para ROS del 58.5%. Al comparar las células infectadas con rotavirus WTEW sin tratamiento contra células sin infectar se encontró un valor de $P<0.001$. Al cotejar las células infectadas y tratadas contra las células infectadas sin tratamiento se obtuvieron los valores de P: tiazonilediona $P<0.01$, rosiglitazona $P>0.05$, pioglitazona $P>0.05$, curcumina $P>0.05$ y NAC $P<0.05$ (Anexo 14). En células U937 infectadas y tratadas se obtuvo los siguientes porcentajes de células positivas para ROS: tiazonilediona 42.65%, rosiglitazona 49.7%, pioglitazona 44.95%, curcumina 51.75% y NAC 49.4% (Figura 9- D). Las células infectadas sin tratamiento el porcentaje fue de 72.4%. Al cotejar las células infectadas sin tratamiento con las células no infectadas se obtuvo un valor de $P<0.05$, al comparar con las células infectadas y tratadas con tiazonilediona se encontró una valor de $P<0.001$, con rosiglitazona, pioglitazona, curcumina y NAC se hallaron valores de $P<0.01$ en todos los casos. (Anexo 14).

Al analizar el porcentaje de células REH positivas para antígenos virales en las células infectadas y tratadas con tiazonilediona, rosiglitazona, pioglitazona, curcumina y NAC se obtuvo los siguientes porcentajes: 49.15%, 51.00%, 49.65%, 48.75% y 48.20% respectivamente (Figura 9- B), mientras en las células infectadas con rotavirus pero sin tratamiento se encontró un porcentaje de células positivas para antígenos virales del 84.125%. Al comparar las células infectadas con rotavirus sin tratamiento con células sin infectar se encontró un valor de $P<0.001$, al cotejar las células infectadas y tratadas contra las células infectadas sin tratamiento se hallaron valores de $P<0.001$ para todos los casos (Anexo 15). En células U937 infectadas y tratadas se obtuvo los siguientes porcentajes de células positivas para antígenos virales: tiazonilediona 43.86%, rosiglitazona 47.82%, pioglitazona 49.89%, curcumina 52.75% y NAC 48.42% (Figura 9- E). En células infectadas sin tratamiento se halló un porcentaje de 81,54%. Al cotejar las células infectadas sin tratamiento con las células no infectadas se obtuvo un valor de $P<0.001$ y al comparar las células infectadas contra las infectadas y tratadas se encontraron valores de $P<0.001$ en todos los casos (Anexo 15). Se muestran fotografías representativas de las células no infectadas, infectadas con rotavirus

WTEW no tratadas y células infectadas y con los diferentes tratamientos positivas para ROS y antígenos virales en las líneas REH (Figura 9- C) y U937 (Figura 9- F). Al analizar los resultados obtenidos con el CFCT se observa que la tendencia de la fluorescencia es similar a lo estimado con los porcentajes de células positivas para ROS con los diferentes tratamientos en ambas líneas celulares (Figura 9G REH, Figura 9H U937).

Los resultados muestran que en células de la línea REH los niveles de ROS disminuyen significativamente cuando las células infectadas y tratadas con tiazonilediona o NAC, pero cuando son tratadas con rosiglitazona, pioglitazona y curcumina no hay una reducción significativa en los niveles de ROS cuando se comparan con células infectadas con rotavirus WTEW sin tratamiento. Mientras en células de la línea U937 se observa que en las células infectadas y tratadas con tiazonilediona, rosiglitazona, pioglitazona, curcumina y NAC tienen reducción significativa de los niveles de ROS al cotejar contra las células infectadas y sin tratamiento. Al evaluar los porcentajes de células positivas para antígenos virales se observa que en ambas líneas celulares se presenta reducción significativa cuando son tratadas con los diferentes inhibidores de la vía NFκB o con NAC con respecto a las células infectadas y sin tratamiento. Los resultados sugieren que la vía NFκB y los ROS se asocian con el proceso infeccioso de rotavirus o son inducidos al activarse NFκB como respuesta celular ante la infección (224, 115). Dado que el número de células en las que se detectó antígenos rotavirales disminuyó significativamente y fue mayor la disminución respecto al porcentaje de células que expresan ROS, sugiere que la infección está relacionada con el aumento de ROS y el tratamiento con los fármacos reduce la infección porque se reducen los ROS o su activación y esto repercute en el número de células infectadas.

Figura 9. En las células de las líneas REH y U937 infectadas con rotavirus WTEW los niveles de ROS y de antígenos virales se reducen con el tratamiento con inhibidores de la vía NFκB Tiazonilediona, Rosiglitazona, Pioglitazona y Curcumina o con NAC. Las células se sembraron en cajas de 96 pozos fueron infectadas con un MOI de 2 de rotavirus WTEW, luego se trataron con NAC 30 μM e inhibidores de la vía NF-κB: Tiazonilediona 3,3 mM, Pioglitazona 0,15 mM, Rosiglitazona 3,3 mM y Curcumina 30 μM, a las 9 h.p.i se les adiciono dihidroetidio (DHE) se incubo por 30 min y se analizó la presencia de ROS usando el kit Cellomics® Oxidative Stress I, si hay ROS presentes en las células oxida el (DHE) y lo convierte etidio que se intercala en el DNA, generando fluorescencia (roja). A parte con los remanentes se analizó la presencia de antígenos rotavirales usando anticuerpos contra proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus mediante inmunocitoquímica (coloración rojiza). Como control se utilizaron células sin infectar y células infectadas sin inhibidores. **(A, D)** Conteo del porcentaje de células positivas para ROS en células de las líneas **(A)** REH, **(D)** U937 tratadas con inhibidores de la vía NF-κB y NAC. **(B, E)** Conteo del porcentaje de infección de proteínas estructurales y no estructurales en células de las líneas **(B)** REH, **(E)** U937 tratadas con inhibidores de NF-κB y NAC. **(C, F)** Fotografías representativas de células tratadas con inhibidores de la vía NF-κB y NAC e infectadas rotavirus WTEW, células infectadas sin tratamiento y células sin infectar evaluadas con DHE (fluorescencia roja) e inmunocitoquímica en las líneas **(C)** REH, **(F)** U937. **(G, H)** Calculo de la fluorescencia total corregida (CTCF) por medio del programa ImageJ en células de las líneas **(G)** REH, **(H)** U937. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).



7.7. La expresión de las proteínas celulares COX, NFκB fosforilado, IKK, PPARγ, PDI y HSP90 se modifica al tratar con NAC células U937 infectadas con rotavirus WTEW.

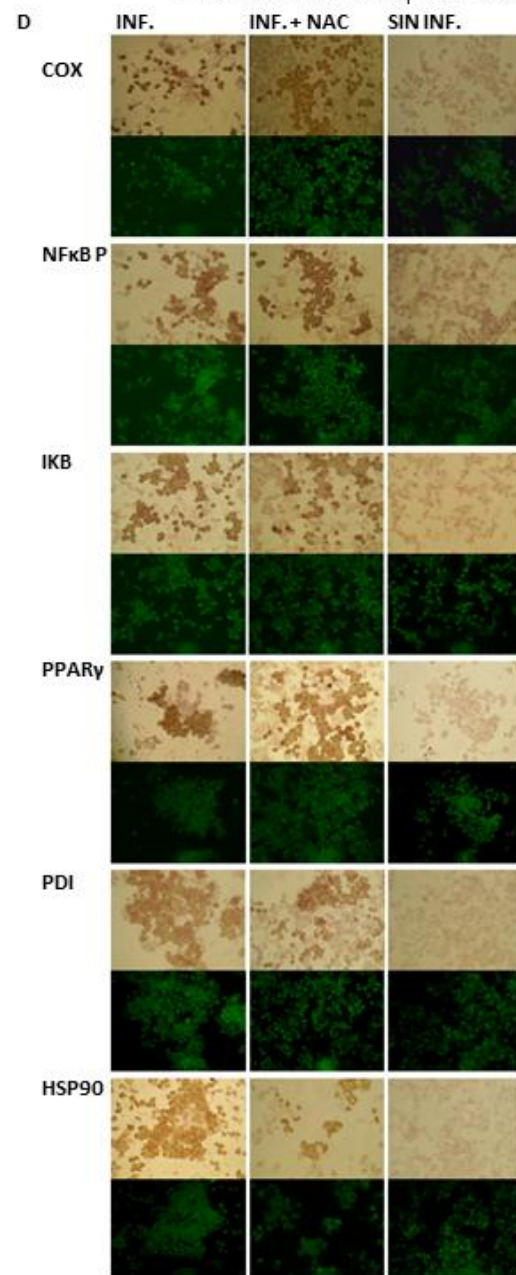
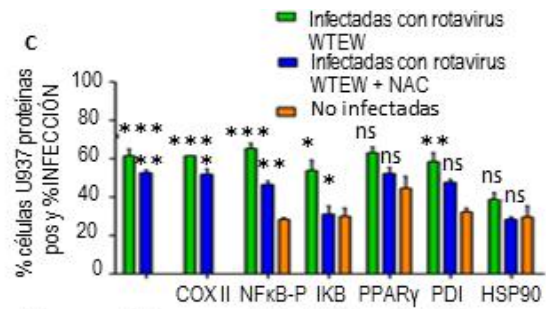
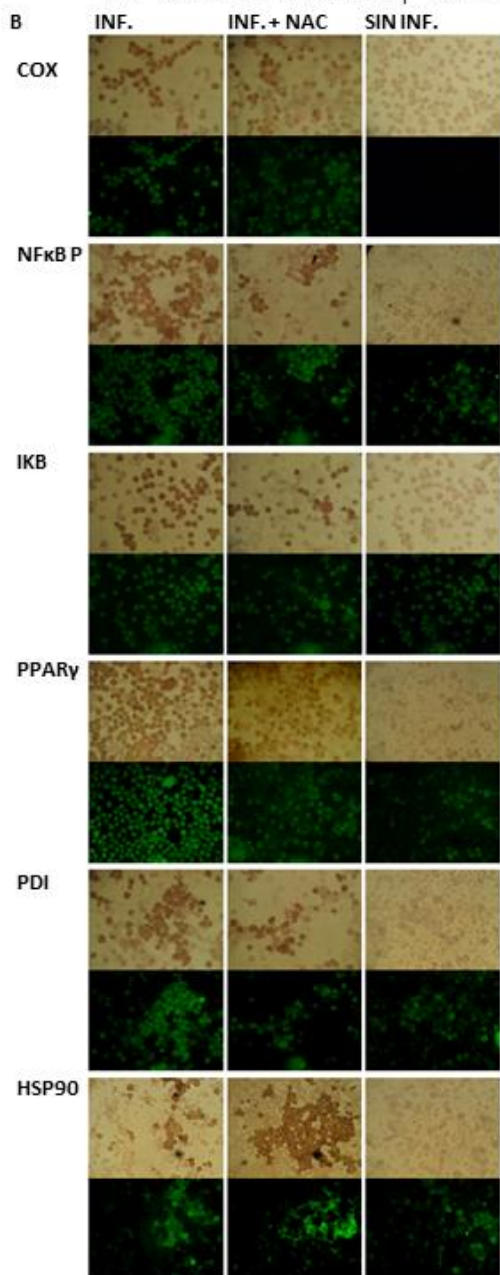
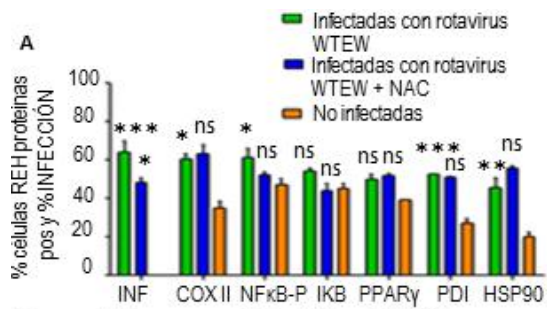
La infección por rotavirus induce aumento en los niveles de NFκB, COX II, PPARγ, PDI y ROS [221], además se sabe que NFκB puede inducir aumento en los niveles de ROS y viceversa [109] por lo cual se quiere evaluar que sucede con los niveles de estas proteínas cuando se neutralizan los ROS con el antioxidante e inhibidor de la vía NFκB, NAC. Para evaluar cambios en la expresión de proteínas celulares NF-κB fosforilado, IKK, COX II, PPARγ, PDI y proteína de choque térmico HSP90 las células se sembraron en cajas de 96 pozos se realizó el proceso de infección con rotavirus WTEW con un MOI de 2 y se trataron NAC 30 μM (concentración pre-establecida en trabajos previos del laboratorio), a las 9 h.p.i. se adiciono el DHE, se incubó por 30 min y se cosecharon. Posteriormente se hizo la técnica de inmunocitoquímica y en estas mismas laminillas se hizo procedimiento de inmunofluorescencia. Como control se utilizaron células no infectadas en las cuales se llevó a cabo igual procedimiento. Para esto, se adicionaron los anticuerpos primarios Ac de cabra anti COX, PDI y PPARγ y Ac de conejo anti IKK, HSP90 y NFκB fosforilado a una concentración de 0,2 μg/ml, posteriormente se adiciono Ac policlonal IgG anti-cabra conjugado con FITC para proteínas COX, PDI y PPARγ en una concentración de 0.5 μg/ml, y Ac policlonal IgG anti-conejo conjugado con FITC para proteínas IKK, HSP90 y NFκB fosforilado a una concentración 0,57 μg/ml. Los resultados obtenidos en el microscopio de fluorescencia son el promedio de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 10 fotografías tomadas para cada una de las líneas celulares y para cada uno de los tratamientos (infectadas, infectadas + NAC y no infectadas) y cada una de las proteínas evaluadas. En el análisis estadístico se compararon, el porcentaje de células positivas para cada proteína en células infectadas con rotavirus WTEW contra células sin infectar, al igual que se cotejaron células infectadas y tratadas con NAC con las células infectadas sin tratamiento con el fin de hallar el nivel de significancia.

Se encontró que en células de las líneas REH los porcentajes de células positivas para cada proteína en células sin infectar (Sin Inf.), en células infectadas con rotavirus WTEW (Inf) y en células infectadas y tratadas con NAC (Inf + NAC), son los siguientes para la proteína IKK: 45.26% (Sin inf.), 54.03% (Inf.) y 43.99% (Inf. + NAC), para NFκB P: 47.23% (Sin inf.), 61.40% (Inf.) y 52.13% (Inf. + NAC), PPARγ 44.25% (Sin inf.), 50% (Inf.) y 51.74% (Inf. + NAC), COX II: 35.04% (Sin inf.), 62.66% (Inf.) y 61.2% (Inf. + NAC), PDI: 27.31% (Sin inf.), 52.62% (Inf.) y 51.07% (Inf. + NAC), HSP90: 20.18% (Sin inf.), 58.61% (Inf.) y 53.91% (Inf. + NAC). El porcentaje de infección fue de 64.12% en células infectadas con rotavirus WTEW sin tratamiento y del 48.20% en células infectadas y tratadas con NAC (Figura 10- A). Al comparar los porcentajes de células positivas para cada proteína en células sin infectar contra células infectadas con rotavirus WTEW se hallaron los siguientes valores de P: IKK y PPARγ P>0.05, NFκB P y COX II P<0.05, para HSP90 P<0.01 y para PDI P<0.001. En el porcentaje de infección comparando células infectadas vs células infectadas y tratadas con NAC se encontró una valor de P<0.05. Cuando se cotejaron los porcentajes de cada proteína en células infectadas contra células infectadas y tratadas con NAC se obtuvieron los valores de P>0.05 que indica que no hubo una diferencia significativa con o sin el tratamiento con

NAC. En el porcentaje de infección comparando células infectadas vs células infectadas y tratadas con NAC se encontró un valor de $P < 0.01$ (Anexo 16).

En células de las líneas U937 los porcentajes de células positivas para cada proteína en células sin infectar (Sin Inf.), en células infectadas con rotavirus WTEW (Inf) y en células infectadas y tratadas con NAC (Inf + NAC), son los siguientes para la proteína I κ B: 30.02% (Sin inf.), 54.28% (Inf.) y 31.04% (Inf. + NAC), para NF κ B P: 28.5% (Sin inf.), 65.54% (Inf.) y 46.54% (Inf. + NAC), PPAR γ 44.5% (Sin inf.), 63.3% (Inf.) y 52.71% (Inf. + NAC), COX II: 0.05% (Sin inf.), 61.58% (Inf.) y 51.88% (Inf. + NAC), PDI: 32.22% (Sin inf.), 58.49% (Inf.) y 47.74% (Inf. + NAC), HSP90: 29.65% (Sin inf.), 58.6138.91% (Inf.) y 28.42% (Inf. + NAC). El porcentaje de infección fue de 61.60% en células infectadas con rotavirus WTEW sin tratamiento y del 52.79% en células infectadas y tratadas con NAC (Figura 10- C). Al comparar los porcentajes de células positivas para cada proteína en células sin infectar contra células infectadas con rotavirus WTEW se hallaron los siguientes valores de P: I κ B $P < 0.05$, NF κ B P y COX II $P < 0.001$, PPAR γ y HSP90 $P > 0.05$ y para PDI $P < 0.01$. En el porcentaje de infección comparando células infectadas contra células infectadas y tratadas con NAC se encontró un valor de $P < 0.001$. Cuando se cotejaron los porcentajes de cada proteína en células infectadas contra células infectadas y tratadas con NAC se obtuvieron los valores de P: I κ B y COX II $P < 0.05$, PPAR γ , HSP90 y PDI $P > 0.05$ y para NF κ B $P < 0.01$. En el porcentaje de infección comparando células infectadas vs células infectadas y tratadas con NAC se encontró un valor de $P < 0.01$ (Tabla 18). Fotografías representativas de los niveles de cada una de las proteínas evaluadas e infección en células de las líneas REH (Figura 10- B) y U937 (Figura 10- D).

Los resultados muestran que en células de la línea REH aunque hay una tendencia a disminuir la expresión de las proteínas celulares al tratarlas con NAC, no existen diferencias significativas en los niveles de las proteínas COX, NF κ B fosforilado, I κ B, PPAR γ , PDI y HSP90, mientras en células de la línea U937 se presentan disminución significativa cuando las células son infectadas pero tratadas con NAC en las proteínas I κ B, NF κ B fosforilado y COX II. Estos hallazgos sugieren que la expresión de proteínas celulares analizadas en células REH no están directamente relacionadas con la actividad oxidativa de la célula por lo cual al aplicar NAC no afecta tanto su expresión. Igualmente, aunque NAC en células normales puede inhibir la vía NF κ B, por alguna razón no lo está haciendo en REH, quizá porque está constitutivamente expresado [221]. Sin embargo, llama la atención que el porcentaje de infección de rotavirus se afecta por igual al tratarlas con NAC, en las dos líneas tumorales, sugiriendo que el mecanismo oxidativo durante el ensamblaje del virión es requerido independientemente de la línea tumoral.



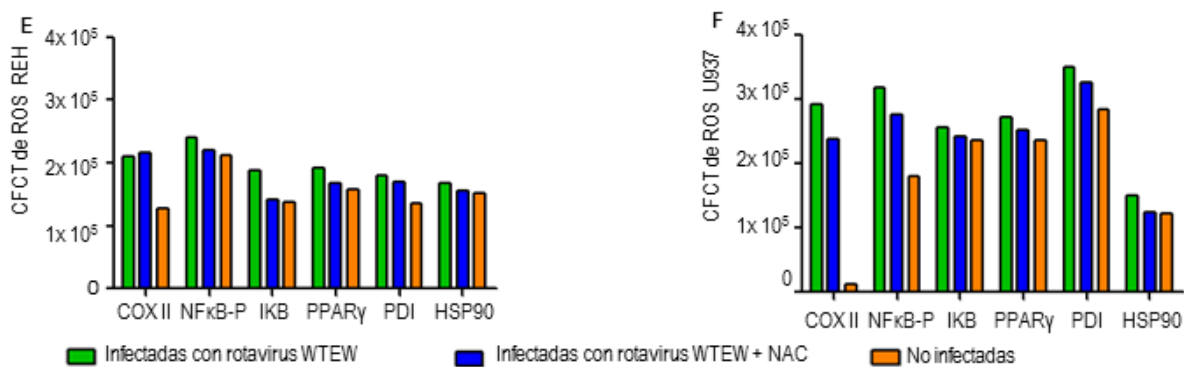


Figura 10. Infección de células con aislamiento rotaviral WTEW y tratamiento con NAC induce disminución en los niveles de proteínas celulares COX, NFκB fosforilado, IKB, PPARγ, PDI y HSP90 dependiendo de la línea celular. Las células se sembraron en cajas de 96 pozos se infectaron con un MOI de 2 de rotavirus WTEW, se trataron con NAC 30 μM (concentración pre-establecida trabajos previos de nuestro laboratorio), se cosecharon a las 9 h.p.i y se analizó la presencia de antígenos rotavirales usando anticuerpos contra proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus mediante inmunocitoquímica. Posteriormente se adicionaron los anticuerpos primarios Ac de cabra anti COX, PDI y PPARγ y Ac de conejo anti IKB, HSP90 y NFκB fosforilado a una concentración de 0.2 μg/ml se incuban, luego se adiciona Ac policlonal IgG anti-cabra conjugado con FITC (Santa cruz Biotechnology®) para proteínas COX, PDI y PPARγ en una concentración de 0.5 μg/ml, y Ac policlonal IgG anti-conejo conjugado con FITC (Santa cruz Biotechnology®) para proteínas IKB, HSP90 y NFκB fosforilado 0.57 μg/ml. Las células con presencia de las proteínas evaluadas generan fluorescencia (verde). (A, C) Conteo del porcentaje de infección y del porcentaje de células positivas para las proteínas evaluadas en células de las líneas (A) REH, (C) U937. (B, D) Fotografías representativas de células infectadas con rotavirus WTEW sin tratamiento, células tratadas con NAC e infectadas rotavirus WTEW y células sin infectar evaluadas para proteínas COX, NFκB fosforilado, IKB, PPARγ, PDI y HSP90 (fluorescencia verde) e inmunocitoquímica en las líneas (coloración rojiza) en células de las líneas (B) REH, (D) U937. (E, F) Calculo de la fluorescencia total corregida (CTCF) por medio del programa ImageJ en células de las líneas (E) REH, (F) U937. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P<0.001 (altamente significativo).

7.8. La fragmentación del DNA y su reparación se modifica al tratar con NAC células REH y U937 infectadas.

Se conoce que los ROS oxidan el DNA generando lesiones en sus bases, y que el ataque oxidativo por los ROS endógenos es una fuente común de rupturas del DNA de cadena sencilla por la desintegración de deoxirribose oxidada. Por esto, evaluamos los niveles de fragmentación nuclear, las rupturas en el DNA y la activación de mecanismos de reparación valorado por la actividad de la PARP. Para esto las células se sembraron en cajas de 96 pozos, se realizó el proceso de infección con rotavirus WTEW, luego se trataron con NAC 30 μ M (concentración pre-establecida en trabajos previos del laboratorio) y se cosecharon a las 9 h.p.i.. Posteriormente se hizo la técnica de inmunocitoquímica y en las mismas laminillas se hizo procedimiento para el análisis de fragmentación nuclear con la tinción de yoduro de propidio, o evaluación de las rupturas del DNA mediante técnica de TUNEL. Los mecanismos de reparación de estos daños se evaluaron analizando PARP a través de anticuerpos que reconocen la proteína específicamente, procedimientos descritos anteriormente.

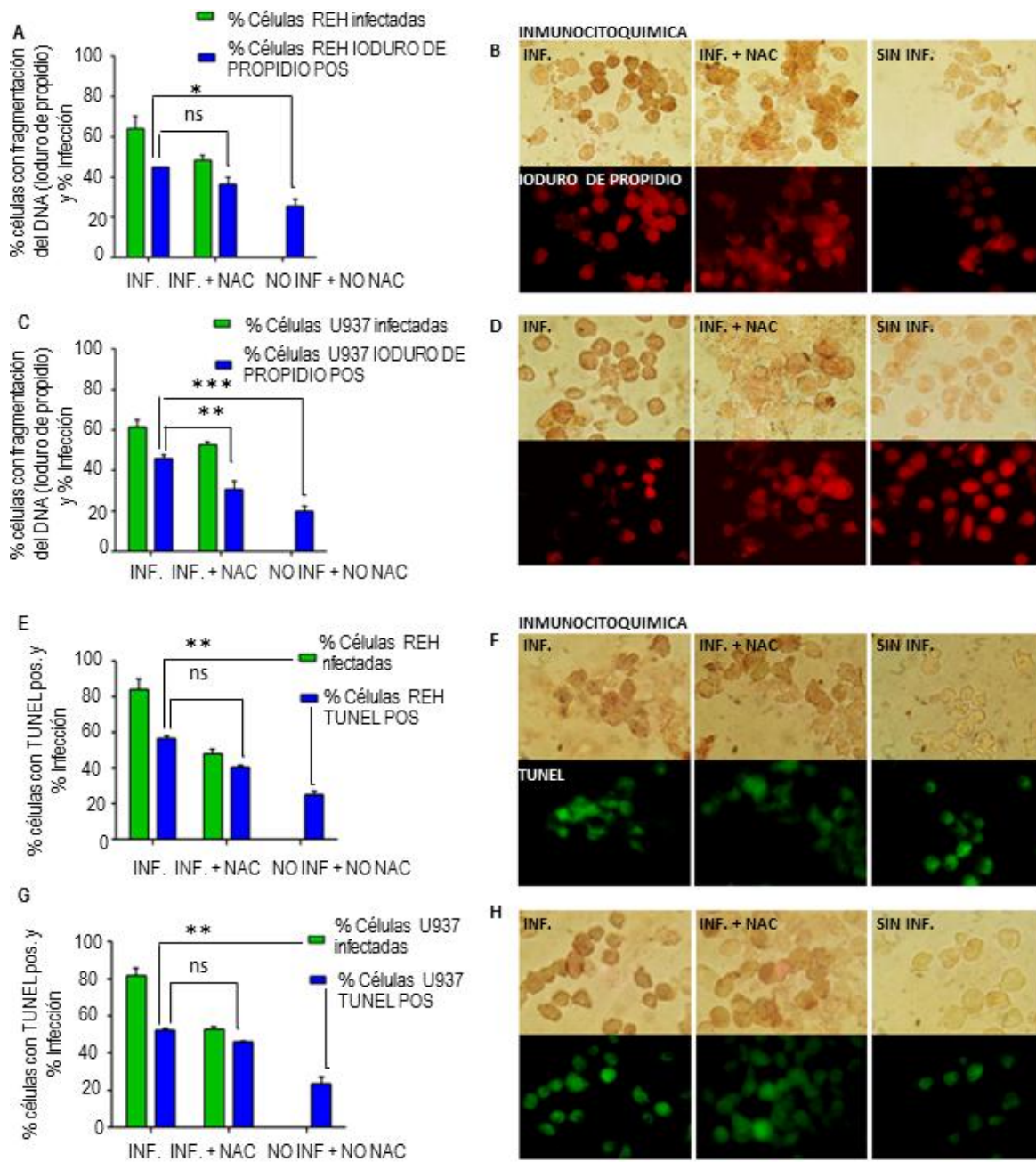
Los resultados obtenidos en los ensayos de yoduro de propidio, TUNEL y PARP son el promedio de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 10 fotografías tomadas para cada una de las líneas celulares y para cada uno de los tratamientos (infectadas, infectadas + NAC y no infectadas) y en cada uno de los ensayos realizados. En el análisis estadístico se compararon, el porcentaje de células con fragmentación del DNA o positivas para reacción de TUNEL o para PARP en células infectadas con rotavirus WTEW contra células sin infectar, al igual que se cotejaron células infectadas y tratadas con NAC con las células infectadas sin tratamiento con el fin de hallar el nivel de significancia.

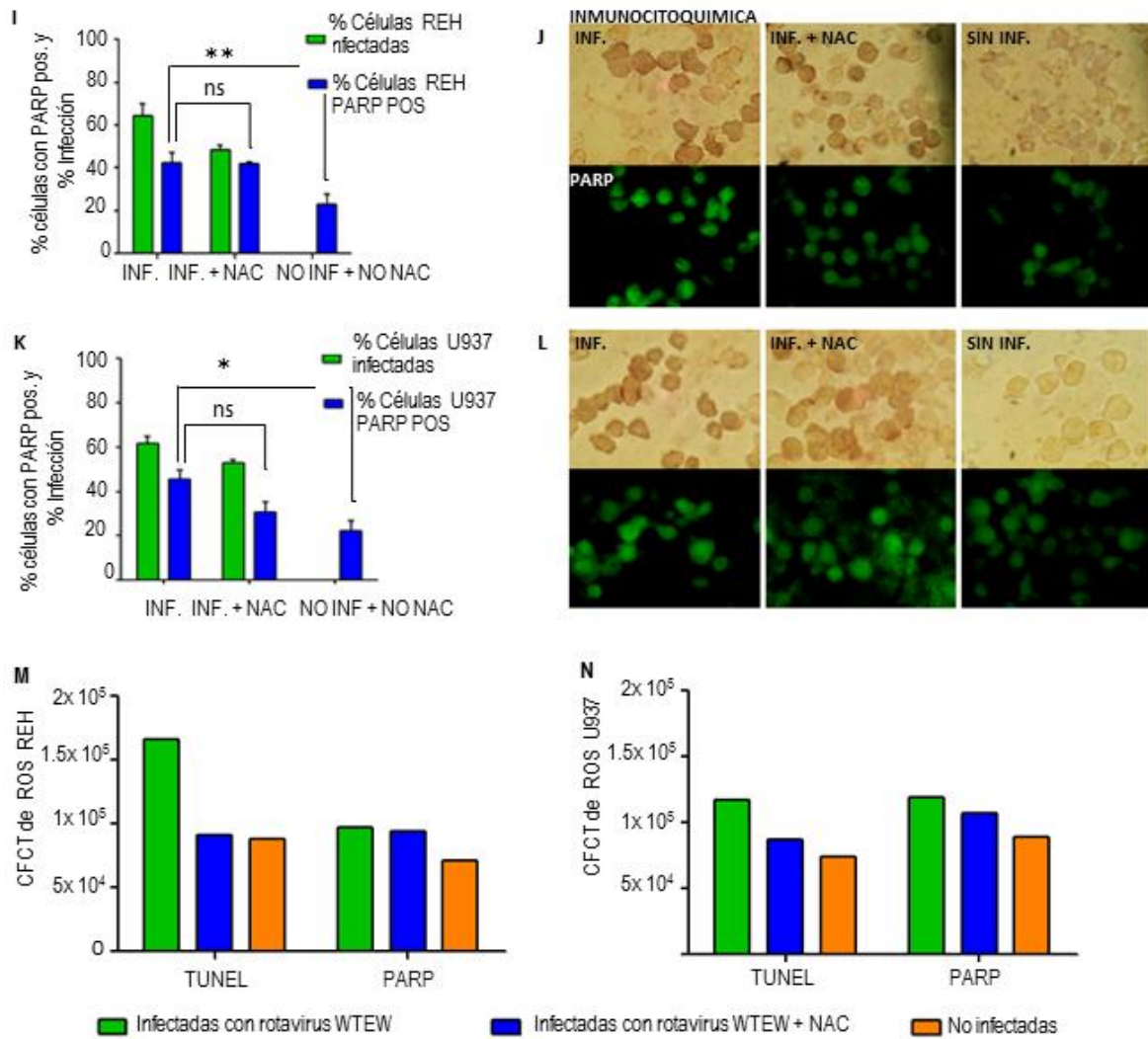
En células de la línea REH los porcentajes de células con fragmentación del DNA en células sin infectar (Sin Inf.), en células infectadas con rotavirus WTEW (Inf) y en células infectadas y tratadas con NAC (Inf + NAC), son los siguientes: 25.5% (Sin inf.), 44.85% (Inf.) y 36.59% (Inf. + NAC) (Figura 11- A). Al comparar los porcentajes de células con fragmentación del DNA en células sin infectar contra células infectadas con rotavirus WTEW se halló un valor de $P < 0.05$. Cuando se cotejó el porcentaje de fragmentación del DNA en células infectadas contra células infectadas y tratadas con NAC se obtuvo un valor de $P > 0.05$ (Anexo 18). Los porcentajes de células positivas para TUNEL son: 24.86% (Sin inf.), 56.42% (Inf.) y 40.66% (Inf. + NAC) (Figura 11- E). Al cotejar los porcentajes de células TUNEL positivas en células sin infectar contra células infectadas con rotavirus WTEW se halló un valor de $P < 0.001$. Cuando se comparó el porcentaje de células TUNEL positivas en células infectadas contra células infectadas y tratadas con NAC se obtuvo un valor de $P < 0.01$ (Anexo 18). Los porcentajes obtenidos en células positivas para PARP son los siguientes: 23.03% (Sin inf.), 42.34% (Inf.) y 41.905% (Inf. + NAC) (Figura 11- I). Al comparar los niveles de células positivas para PARP en células sin infectar contra células infectadas con rotavirus WTEW se obtuvo un valor de $P < 0.05$, mientras al cotejar los niveles de PARP en células infectadas contra células infectadas y tratadas con NAC se halló un valor de $P > 0.05$ (Anexo 18).

Se halló que en células de la línea U937 los porcentajes de células con fragmentación del DNA son los siguientes: 19.95% (Sin inf.), 45.80% (Inf.) y 30.91% (Inf. + NAC) (Figura 11- C). Al comparar los porcentajes de células con fragmentación del DNA en células sin infectar contra células infectadas con rotavirus WTEW se obtuvo un valor de $P < 0.01$. Cuando se cotejó el porcentaje de fragmentación del DNA en células infectadas contra células infectadas y tratadas con NAC se obtuvo un valor de $P < 0.05$ (Tabla 20). Los porcentajes de células positivas para TUNEL son: 23.39% (Sin inf.), 52.10% (Inf.) y 45.92% (Inf. + NAC) (Figura 11- G). Al cotejar los porcentajes de células TUNEL positivas en células sin infectar contra células infectadas con rotavirus WTEW se encontró un valor de $P < 0.01$. Cuando se comparó el porcentaje de células TUNEL positivas en células infectadas contra células infectadas y tratadas con NAC se obtuvo un valor de $P > 0.05$ (Anexo 19). Los porcentajes hallados en células positivas para PARP fueron: 22.25% (Sin inf.), 45.36% (Inf.) y 30.74% (Inf. + NAC) (Figura 11- K). Cuando se compararon los niveles de células positivas para PARP en células sin infectar contra células infectadas con rotavirus WTEW se obtuvo un valor de $P < 0.05$, mientras al cotejar los niveles de PARP en células infectadas contra células infectadas y tratadas con NAC se halló un valor de $P > 0.05$ (Anexo 19).

Los resultados muestran que aunque hay una tendencia a disminuir la actividad analizada, cuando las células infectadas son tratadas con NAC, solo se disminuye significativamente los niveles de TUNEL en células de la línea REH y los niveles de fragmentación del DNA analizadas mediante la tinción de yoduro de propidio en células de la línea U937. Esto sugiere que los niveles de ROS están relacionados con el daño del DNA.

Figura 11. El tratamiento con NAC en células infectadas con rotavirus WTEW no disminuyen los niveles de fragmentación del DNA, reacción de TUNEL y presencia de PARP en células de las líneas REH y U937. Las células se sembraron en cajas de 96 pozos, fueron infectadas con un MOI de 2 de rotavirus WTEW, se trataron con NAC 30 μ M (concentración pre-establecida trabajos previos de nuestro laboratorio), se cosecharon a las 9 h.p.i. Posteriormente se analizó la presencia de antígenos rotavirales usando anticuerpos contra proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus mediante inmunocitoquímica (coloración rojiza), la condensación de la cromatina y fragmentación nuclear con el reactivo yoduro de propidio (fluorescencia roja) (A, B, C, D), la incorporación de oligonucleótidos marcados con fluoresceína mediante el método de TUNEL (verde) (E, F, G, H) o la presencia de la enzima Poli ADP Ribosa Polimerasa (PARP) que participa en procesos de reparación del DNA (verde) (I, J, K, L). (A, C) Conteo del porcentaje de células con cambios en el patrón de distribución de la cromatina evaluada con yoduro de propidio en células de las líneas (A) REH, (C) U937. (B, D) Fotografías representativas de células sin infectar, células infectadas con rotavirus WTEW o infectadas y tratadas con NAC evaluadas con yoduro de propidio y por inmunocitoquímica en células de las líneas (B) REH, (D) U937. (E, G) Conteo del porcentaje de células fluorescentes positivas para la reacción de TUNEL en las líneas celulares (E) REH, (G) U937. (F, H) Fotografías de células sin infectar, células infectadas con rotavirus WTEW o infectadas y tratadas con NAC evaluadas con la reacción de TUNEL y por inmunocitoquímica en células de las líneas (F) REH, (H) U937. (I, K) Conteo del porcentaje de células evaluadas con PARP en las líneas celulares (I) REH, (K) U937. (J, L) Fotografías representativas de células sin infectar, células infectadas con rotavirus WTEW o infectadas y tratadas con NAC evaluadas para la presencia de la PARP y por inmunocitoquímica en células de las líneas (J) REH, (L) U937. (M, N) Cálculo de la fluorescencia total corregida (CTCF) por medio del programa ImageJ en células de las líneas (M) REH, (N) U937. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= $P > 0.05$ (no significativo); * = $P < 0.05$ (significativo); ** = $P < 0.01$ (muy significativo); *** = $P < 0.001$ (altamente significativo).





8. DISCUSIÓN

Los virus oncolíticos son virus que específicamente infectan y lisan células tumorales mientras las células normales no son infectadas y su toxicidad en estas es limitada. Cada virus oncolítico tiene una estrategia que le permite ser selectivo solo hacia las células tumorales es así como por ejemplo el adenovirus oncolítico Onyx- 015 tiene selectividad por células tumorales carentes de la proteína p53 o como el *Reovirus tipo 3 Dearing (Reolysin)* que infecta células con el oncogén RAS activo.

En la literatura no se encuentran reportes de susceptibilidad de las células de la línea REH a la infección por rotavirus, mientras en la línea U937 trabajos previos del Laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Universidad Nacional de Colombia demuestran que es susceptible a la infección de los aislamientos rotavirales WWM, TRUY y ECwt, además de permitir su replicación y producción de viriones. Sin embargo, no se tiene información acerca de la susceptibilidad a la infección de ambas líneas celulares al aislamiento rotaviral WTEW. En este trabajo se encontró que células REH se infectan y producen viriones desde la 5 h.p.i. e incrementan hasta las 11 h.p.i. (Figura 3- A, C) de manera similar a lo reportado para U937 [225].

En el presente estudio se encontraron porcentaje de células de las líneas REH y U937 positivas para Anexina V a las 11 h.p.i del 27,2% y 21,79% respectivamente (Figuras 4- A, B), niveles considerados relativamente bajos. Estos resultados son similares a los hallados en otros estudios que indican la existencia de líneas celulares tumorales (TG98, Daudi y D32) que tienen muy poco incremento en su unión a la Anexina V después de ser inducidas a muerte pero que presentan características propias de apoptosis tales como fragmentación nuclear, cortes de pro-caspasas y sustratos de caspasas. En células MA104 y HT29 infectadas con rotavirus RRV o CRW-8 la unión a la Anexina V, a las 11 h.p.i., se presentó en el 21-22% y 43% respectivamente célula [6]. Este mismo estudio se encontró que en células Caco-2 diferenciadas parcialmente e infectadas por rotavirus no se induce muerte celular detectada por Anexina V durante el periodo de 24 horas. En cambio, se indujo fragmentación del DNA en células Caco-2 plenamente diferenciadas por la infección con rotavirus RRV, lo que indica que el nivel de exposición de la PS se ve influenciada por el grado de diferenciación de la célula [6]. Los resultados obtenidos en este estudio en los cuales el porcentaje de células de líneas REH y U937 positivas para Anexina V a las 11 h.p.i. es bajo, permite sugerir que el proceso de entrada del virus a la célula y su replicación no induce exposición de la PS, aparentemente los cambios se relacionan con la salida de los viriones de la célula. Sería interesante evaluar la unión de la Anexina V a las líneas celulares REH y U937 durante periodos de tiempo más largos para evaluar si se presenta o no aumento en los porcentajes de células positivas para Anexina V.

Se ha reportado que las células que exponen PS en la membrana son reconocidas por macrófagos en un intento de remoción de células bajo apoptosis [212]. Sin embargo, la fagocitosis puede ser inhibida de maneras dosis dependiente por liposomas que contienen PS y por análogos

estructurales pero no por liposomas que contienen otros fosfolípidos aniónicos [213]. Con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, en los cuales hay un bajo porcentaje de células de líneas REH y U937 positivas para Anexina V a las 11 h.p.i. al igual que con Sp2/0-Ag14 (36.5 % de células positivas para Anexina V a las 12 h.p.i infectadas con la cepa de rotavirus Wt1-5) [219] se puede sugerir que rotavirus evita la exposición de la PS en estadios iniciales de la infección como un mecanismo para eludir células fagocíticas, mientras ocurre su ciclo replicativo.

Se conoce que la proteína NSP1 durante la infección por rotavirus produce activación de vías de supervivencia como PI3K y NFκB durante horas tempranas de la infección (2 a 8 h.p.i.) con lo cual evita la muerte prematura de la célula hospedera [8]. Esto correlaciona con el ensayo de MTT y con el de resazurina en los cuales se observa que la infección por rotavirus en células REH no induce cambios significativos en la actividad metabólica durante 11 h.p.i. (Anexo 10, Figura 7G). No obstante, en las células U937 se percibe una disminución en la actividad metabólica llegando a un porcentaje de supervivencia de 51.5% a las 11 h.p.i. ($P < 0.01$) (Anexo 10, Figura 7H). Esto sugiere que el proceso infeccioso de rotavirus no requiere de la disminución de la actividad metabólica de las células de las líneas REH y U937 en las primeras h.p.i. para culminar su ciclo replicativo. Cuando se infectan con MOI de 4 y 10 hay cambios significativos en los porcentajes de supervivencia en las 11 h.p.i. en ambas líneas. Estos resultados sugieren que la disminución en la actividad metabólica es dependiente del MOI con que han sido infectadas las células de las líneas REH (Anexo 12, Figura 7K) y U937 (Anexo 12, Figura 7L).

Se ha reportado que la proteína NSP4 de rotavirus puede desestabilizar membranas, lo que podría causar perturbaciones en la mitocondria. Los resultados muestran que la infección por rotavirus WTEW induce pérdida en el potencial de membrana mitocondrial (PPMM) que aumenta durante las h.p.i. en las células de las líneas REH y U937. Se sabe que cuando existe PPMM se permite la salida de elementos pro-apoptóticos desde la mitocondria al citoplasma, y como la PPMM incrementa durante las h.p.i. indica que no es un evento transitorio, sugiriendo que la muerte celular inducida por rotavirus WTEW en células de las líneas REH y U937 es un proceso apoptótico.

Al analizar la permeabilidad de la membrana citoplasmática utilizando el reactivo 7AAD, no se encontraron cambios significativos con respecto a las células sin infectar en la línea celular U937 (Figura 4- E, F), mientras en las REH si se presentan cambios significativos desde las 3 h.p.i. con respecto a las células sin infectar, pero sin embargo el porcentaje de células positivas sigue siendo bajo (17,25%) (Figura 4- G, H), sugiriendo que no se están presentando cambios tempranos en membrana citoplasmática. Estos cambios pueden ser eventos posteriores en el proceso de muerte, que estaría más relacionado con apoptosis tardía o con un proceso necrótico.

Otro de los marcadores de muerte celular que se analizó son los niveles de fragmentación del DNA evaluados con las tinciones de Hoescht (figura 5- A, B, C, D) e ioduro de propidio (Figura 5- E, F, G, H). Se encontró que hay un incremento gradual desde la 1 h.p.i. hasta las 11 h.p.i. de los niveles de células con cambio en el patrón de distribución de la cromatina en las líneas celulares REH y U937, lo que sugiere que se está induciendo una muerte celular posiblemente por apoptosis. Esto

se corrobora al analizar las células infectadas mediante la técnica de TUNEL y de PARP. En la línea celular REH se encuentra que en el ensayo de TUNEL los porcentajes de células positivas a la 3 h.p.i. son del 42.43% y parecen mantenerse constante hasta las 11 h.p.i. (Figura 6- A, C). Sin embargo, se encontraron altos niveles de PARP en células sin infectar (Figura 6- G, I), sugiriendo que los altos niveles de PARP favorecen la reparación de las rupturas del DNA explicando el no incremento en el porcentaje de células TUNEL positivas cuando son infectadas por rotavirus WTEW. En el caso de las células U937 los niveles de PARP en células sin infectar están entre el 20 y 30%, (Figura 6- J, L) pero en células infectadas los niveles de TUNEL si incrementan progresivamente (Figura 6- D, F) al igual que los porcentajes de células positivas para PARP, lo que estaría sugiriendo que en esta línea celular la infección por rotavirus WTEW induce rupturas del DNA pero a su vez mecanismos de reparación celular.

Intentando relacionar los mecanismos que inducen apoptosis en las líneas celulares REH y U937 se evaluó la presencia de ROS en células infectadas relacionándolas con las no infectadas. En células REH y U937 sin infectar se encontró 14,68% y 34,94% respectivamente desde la 1 h.p.i. (Figura 8- A, C). Se sabe que muchos tipos de células tumorales incrementan los niveles de ROS porque tienen una función importante en el inicio y progresión del cáncer [214-216]. Sin embargo cuando hay excesivos niveles de ROS puede ser toxico para la célula y la puede hacer más susceptible a agentes exógenos. En el caso de células infectadas con rotavirus WTEW los niveles de ROS incrementan durante las h.p.i. en las líneas REH (Figura 8- A, B) y U937 (Figura 8 -C, D) confirmando lo que se había encontrado en estudios anteriores de nuestro laboratorio en el cual se halló que en enterocitos de ratón ICR infectados con el rotavirus ECwt se produce incremento de ROS [224] y que el proceso infeccioso de rotavirus está relacionado con un ambiente celular oxidativo. El aumento en los ROS no es progresivo por lo cual se podría sugerir que la célula tiene mecanismos antioxidantes. Los ROS son conocidos por ser capaces de oxidar el DNA, una de las lesiones que más se presenta después de iniciar el estrés oxidativo es la 8 oxoguanina, en mamíferos esta lesión es conocida por ser reparada por mecanismo de escisión de base (BER) que puede llevar a acumulación de rupturas de DNA de cadena sencilla activando la PARP [217]. El mecanismo de reparación por BER es iniciada por la remoción de la base dañada, generando un sitio AP que es sustrato para la endonucleasa APE1, esta enzima corta el extremo 5' de la lesión creando un extremo 3' OH libre, y es en el sitio AP escindido donde se une la PARP en estadios tempranos de BER [218], además se sabe que el ataque oxidativo por los ROS endógenos es una fuente común de rupturas del DNA de cadena sencilla por la desintegración de deoxirribosa oxidada [219]. La PARP es así altamente estimulada en presencia de rupturas del esqueleto del DNA o por lesiones en sus bases las cuales son reparadas por SSRB (*Single-strand break repair*) o BER respectivamente [220]. Al parecer la infección por rotavirus induce incremento en los niveles de ROS desde la 1 h.p.i. se podrían estar generando lesiones en bases del DNA o rupturas del DNA de cadena sencilla lo que estimularía la acumulación de la Poli ADP Ribosa Polimerasa en el núcleo intentando reparar estas lesiones, lo cual se relacionaría con los niveles altos de PARP encontrados desde las primeras h.p.i. en ambas líneas celulares. Esto mismo podría estar generando los niveles altos de células TUNEL positivas desde las primeras h.p.i. en ambas líneas celulares porque al generarse extremos 3'OH libres en el DNA, ya sea durante el mecanismo de reparación de BER o

por rupturas del DNA de cadena sencilla generadas directamente por los ROS (y una vez las células son cosechadas y fijadas), serían susceptibles a la reacción de TUNEL en la cual hay incorporación de nucleótidos (deoxyuridine triphosphate dUTP) marcados con fluorescein usando la enzima Terminal Deoxinucleotidyl Transferasa (TdT). Hallazgos que confirman los porcentajes de células con fragmentación del DNA hallados en las primeras h.p.i..

Para confirmar si la actividad de los ROS favorece la infección de rotavirus en células tumorales, se neutralizaron los ROS con el NAC o con Inhibidores de la vía NFκB tiazonilediona, rosiglitazona, pioglitazona y curcumina. Se observó que en las células de la línea REH no se obtiene diferencias significativas entre los niveles de ROS en células infectadas con rotavirus WTEW y células infectadas y tratadas con pioglitazona, rosiglitazona y curcumina, mientras cuando se tratan con tiazonilediona o NAC si presenta disminución en los niveles de ROS. En las células de la línea U937 se presenta una disminución significativa de los niveles de ROS cuando las células son tratadas con los diferentes medicamentos e infectadas con rotavirus WTEW. El hecho de que las REH no disminuyan sus niveles de ROS frente a algunos de los tratamientos y las U937 si lo haga frente a todos podría sugerir que la respuesta de disminución de los niveles de ROS en células infectadas y tratadas es dependiente del tipo celular. Se ha encontrado que en células provenientes de leucemias linfoblásticas agudas, de las cuales hace parte la línea celular REH, tienen constitutivamente activado complejos de NFκB ya sean heterodímeros de p50- p65 u homodímeros de [221] esto explica que aunque se utilicen agonistas de PPARγ (pioglitazona y rosiglitazona) o curcumina para inactivar NFκB, no hay efecto porque la célula tiene constitutivamente activo el complejo.

La infección por rotavirus induce aumento en los niveles de NFκB, COX II, PPARγ, PDI y ROS en enterocitos de ratón [224], además se sabe que NFκB puede inducir aumento en los niveles de ROS y viceversa [115] por lo cual se evaluaron los niveles de estas proteínas cuando se utiliza NAC. En línea REH infectadas con rotavirus WTEW y las células infectadas y tratadas con NAC no existen diferencias significativas en los niveles de las proteínas COX, NFκB fosforilado, IκB, PPARγ, PDI y HSP90. Esta situación se puede presentar porque no se están disminuyendo los ROS a los niveles en que se hallan en células sin infectar y permanece un exceso de ROS, probablemente por la actividad constitutiva del complejo NFκB, que podrían conservar los niveles de las proteínas. En células de la línea U937 se presentan disminución significativa cuando las células son infectadas y tratadas con NAC en las proteínas IκB, NFκB fosforilado y COX II, probablemente porque en estas células los ROS disminuyen a los niveles encontrados en células sin infectar. La disminución de ROS a niveles hallados en células sin infectar estaría permitiendo que los niveles de proteínas relacionadas con la vía NFκB se redujeran. En el caso de PDI no disminuye su nivel, lo que podría estar indicando que en esta línea celular, como respuesta ante el estrés producido por la infección por rotavirus, se mantienen los niveles de PDI porque su actividad de óxido – reducción sobre otras proteínas que participan en respuesta a estrés permite a la célula tumoral sobrevivir, además se ha encontrado que en células infectadas por rotavirus RRV se induce que PDI se concentre alrededor de los viroplasmos y colocalice con proteínas NSP4 y VP7 que se hallan principalmente en RE. Lo que sugirió que el folding de glicoproteínas virales y probablemente el

ensamble de las TLPs requiere de acciones de chaperonas como la PDI [222]. Así mismo la HSP90 permanece igual porque podría estar permitiendo sobreexpresión de oncoproteínas al protegerlas de su mal plegamiento y degradación, facilitando la supervivencia de las células de esta línea tumoral, en este caso también estaría actuando como un control negativo porque es una proteína que no es tan influenciada por la vía de NFκB.

9. CONCLUSIÓN

La heterogeneidad genética de las células tumorales probablemente influye en generar marcadores de muerte sin una relación bioquímica aparente entre sí, como se pueden observar en células normales.

Se conoce que rotavirus presenta mecanismos anti-apoptóticos durante 2-8 h.p.i. Probablemente WTEW en las líneas tumorales utiliza estos mismos mecanismos, explicando que algunos de los marcadores de muerte estudiados en este trabajo se presenten tardíamente, respecto al ciclo infeccioso.

10. RECOMENDACIONES

Continuar profundizando en estos y otros marcadores de muerte desde las 11 h.p.i hasta explicar la lisis total, observada en las mismas líneas tumorales en tiempo aproximado de 24-48 h.pi., dependiendo de la línea tumoral

BIBLIOGRAFÍA

1. Bray, F., et al., *Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008*. Int J Cancer, 2013. **132**(5): p. 1133 -45.
2. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69 -90.
3. Parato, K.A., et al., *Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(12): p. 965 -76.
4. Chaibi, C., et al., *Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells*. Virology, 2005. **332**(2): p. 480 -90.
5. Superti, F., et al., *Induction of apoptosis in HT-29 cells infected with SA-11 rotavirus*. J Med Virol, 1996. **50**(4): p. 325 -34.
6. Halasz, P., G. Holloway, and B.S. Coulson, *Death mechanisms in epithelial cells following rotavirus infection, exposure to inactivated rotavirus or genome transfection*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 8): p. 2007 -18.
7. Perez, J.F., et al., *Oncosis in MA104 cells is induced by rotavirus infection through an increase in intracellular Ca²⁺ concentration*. Virology, 1998. **252**(1): p. 17 -27.
8. Bagchi, P., et al., *Rotavirus nonstructural protein 1 suppresses virus-induced cellular apoptosis to facilitate viral growth by activating the cell survival pathways during early stages of infection*. J Virol, 2010. **84**(13): p. 6834 -45.
9. Ong, F.S., et al., *Personalized medicine and pharmacogenetic biomarkers: progress in molecular oncology testing*. Expert Rev Mol Diagn, 2012. **12**(6): p. 593 -602.
10. Lujambio, A. and S.W. Lowe, *The microcosmos of cancer*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 347-55.
11. Kelly, E. and S.J. Russell, *History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering*. Mol Ther, 2007. **15**(4): p. 651 -9.
12. Liu, T.C., E. Galanis, and D. Kirn, *Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress*. Nat Clin Pract Oncol, 2007. **4**(2): p. 101 -17.
13. Liu, T.C. and D. Kirn, *Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses*. Gene Ther, 2008. **15**(12): p. 877 -84.
14. Ottolino-Perry, K., et al., *Intelligent design: combination therapy with oncolytic viruses*. Mol Ther, 2010. **18**(2): p. 251 -63.
15. Russell, S.J., K.W. Peng, and J.C. Bell, *Oncolytic virotherapy*. Nat Biotechnol, 2012. **30**(7): p. 658 -70.
16. Cripe, T.P., et al., *Targeting cancer-initiating cells with oncolytic viruses*. Mol Ther, 2009. **17**(10): p. 1677 -82.

17. Kirn, D., R.L. Martuza, and J. Zwiebel, *Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions*. Nat Med, 2001. **7**(7): p. 781-7.
18. Saleem M. , et al., Oncolytic virus in cancer therapy. Eu J Science Res, 2010. **40**(1): p. 156-171.
19. Dock, G. The influence of complicating diseases upon leukemia. Am J Med Sci, 1904. **127**(4): 127 -563.
20. Pasquinucci, G., *Possible effect of measles on leukaemia*. Lancet, 1971. **1**(7690): p. 136.
21. Gross, S., *Measles and leukaemia*. Lancet, 1971. **1**(7695): p. 397-8.
22. Zygiert, Z., *Hodgkin's disease: remissions after measles*. Lancet, 1971. **1**(7699): p. 593.
23. Taqi, A.M., et al., *Regression of Hodgkin's disease after measles*. Lancet, 1981. **1**(8229): p. 1112.
24. Bluming, A.Z. and J.L. Ziegler, *Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection*. Lancet, 1971. **2**(7715): p. 105 -6.
25. Senzer, N.N., et al., *Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(34): p. 5763 -71.
26. Wakimoto, H., et al., *Altered expression of antiviral cytokine mRNAs associated with cyclophosphamide's enhancement of viral oncolysis*. Gene Ther, 2004. **11**(2): p. 214 -23.
27. Khuri, F.R., et al., *a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer*. Nat Med, 2000. **6**(8): p. 879 -85.
28. DeWeese, T.L., et al., *A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy*. Cancer Res, 2001. **61**(20): p. 7464 -72.
29. Rampling, R., et al., *Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma*. Gene Ther, 2000. **7**(10): p. 859 -66.
30. Markert, J.M., et al., *Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial*. Gene Ther, 2000. **7**(10): p. 867 -74.
31. Pecora, A.L., et al., *Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers*. J Clin Oncol, 2002. **20**(9): p. 2251 -66.
32. Barker, D.D. and A.J. Berk, *Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection*. Virology, 1987. **156**(1): p. 107 -21.

33. Cody, J.J. and J.T. Douglas, *Armed replicating adenoviruses for cancer virotherapy*. *Cancer Gene Ther*, 2009. **16**(6): p. 473 -88.
34. Toth, K., D. Dhar, and W.S. Wold, *Oncolytic (replication -competent) adenoviruses as anticancer agents*. *Expert Opin Biol Ther*, 2010. **10**(3): p. 353 -68.
35. Aghi, M. and R.L. Martuza, *Oncolytic viral therapies - the clinical experience*. *Oncogene*, 2005. **24**(52): p. 7802 -16.
36. Reid, T., et al., *Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial*. *Gene Ther*, 2001. **8**(21): p. 1618 -26.
37. Miyatake, S.I., *Transcriptional targeting of herpes simplex virus for cell-specific replication*. *J virology*, 1997. **71**(7): p. 5124 -5132.
38. Wong, R.J., et al., *Cytokine gene transfer enhances herpes oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma*. *Hum Gene Ther*, 2001. **12**(3): p. 253 -65.
39. Gomella, L.G., et al., *Phase I study of intravesical vaccinia virus as a vector for gene therapy of bladder cancer*. *J Urol*, 2001. **166**(4): p. 1291-5.
40. Park, B.H., et al., *Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial*. *Lancet Oncol*, 2008. **9**(6): p. 533 -42.
41. Galanis, E., et al., *Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer*. *Cancer Res*, 2010. **70**(3): p. 875 -82.
42. Nakamura, T., et al., *Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(2): p. 209 -14.
43. Freeman, A.I., et al., *Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme*. *Mol Ther*, 2006. **13**(1): p. 221 -8.
44. Laurie, S.A., et al., *A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(8): p. 2555 -62.
45. Comins, C., et al., *Reovirus: viral therapy for cancer 'as nature intended'*. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2008. **20**(7): p. 54 -8-54.
46. Hashiro, G., P.C. Loh, and J.T. Yau, *The preferential cytotoxicity of reovirus for certain transformed cell lines*. *Arch Virol*, 1977. **54**(4): p. 307 -15.
47. Strong, J.E., D. Tang, and P.W. Lee, *Evidence that the epidermal growth factor receptor on host cells confers reovirus infection efficiency*. *Virology*, 1993. **197**(1): p. 405 -11.
48. Strong, J.E. and P.W. Lee, *The v-erbB oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection*. *J Virol*, 1996. **70**(1): p. 612 -6.
49. Vidal, L., et al., *A phase I study of intravenous oncolytic reovirus type 3 Dearing in patients with advanced cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(21): p. 7127 -37.

50. Forsyth, P., et al., *A phase I trial of intratumoral administration of reovirus in patients with histologically confirmed recurrent malignant gliomas*. *Mol Ther*, 2008. **16**(3): p. 627 -32.
51. Desselberger, U., et al., *Rotaviruses and rotavirus vaccines*. *Br Med Bull*, 2009. **90**: p. 37-51.
52. Pesavento, J.B., et al., *Rotavirus proteins: structure and assembly*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. **309**: p. 189-219.
53. Carlson, J.A., et al., *Fatal rotavirus gastroenteritis: an analysis of 21 cases*. *Am J Dis Child*, 1978. **132**(5): p. 477 -9.
54. Rodriguez, W.J., et al., *Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agent in infants and young children*. *J Pediatr*, 1977. **91**(2): p. 188 -93.
55. Parashar, U.D., et al., *Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004*. *J Infect Dis*, 2009. **200 Suppl 1**: p. S9-S15.
56. Parashar, U.D., et al., *Rotavirus and severe childhood diarrhea*. *Emerg Infect Dis*, 2006. **12**(2): p. 304 -6.
57. Cortese, M.M. and U.D. Parashar, *Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)*. *MMWR Recomm Rep*, 2009. **58**(RR -2): p. 1 -25.
58. McClain, B., et al., *X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution*. *J Mol Biol*, 2010. **397**(2): p. 587 -99.
59. Trask, S.D., S.M. McDonald, and J.T. Patton, *Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication*. *Nat Rev Microbiol*, 2012. **10**(3): p. 165 -77.
60. Mathieu, M., et al., *Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion*. *EMBO J*, 2001. **20**(7): p. 1485 -97.
61. Settembre, E.C., et al., *Atomic model of an infectious rotavirus particle*. *EMBO J*, 2011. **30**(2): p. 408 -16.
62. Chen, J.Z., et al., *Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(26): p. 10644 -8.
63. Kalica, A.R., J. Flores, and H.B. Greenberg, *Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation*. *Virology*, 1983. **125**(1): p. 194-205.
64. Arias, C.F., et al., *Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity*. *J Virol*, 1996. **70**(9): p. 5832-9.
65. Fiore, L., H.B. Greenberg, and E.R. Mackow, *The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin*. *Virology*, 1991. **181**(2): p. 553 -63.
66. Sanchez-San Martin, C., et al., *Characterization of rotavirus cell entry*. *J Virol*, 2004. **78**(5): p. 2310 -8.

67. Dormitzer, P.R., et al., *The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site*. EMBO J, 2002. **21**(5): p. 885 -97.
68. Estes, M.K., D.Y. Graham, and B.B. Mason, *Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms*. J Virol, 1981. **39**(3): p. 879 -88.
69. Barro, M. and J.T. Patton, *Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(11): p. 4114 -9.
70. Barro, M. and J.T. Patton, *Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7*. J Virol, 2007. **81**(9): p. 4473 -81.
71. Hua, J. and J.T. Patton, *The carboxyl-half of the rotavirus nonstructural protein NS53 (NSP1) is not required for virus replication*. Virology, 1994. **198**(2): p. 567 -76.
72. Hua, J., X. Chen, and J.T. Patton, *Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSP1): the conserved cysteine -rich region is essential for virus-specific RNA binding*. J Virol, 1994. **68**(6): p. 3990 -4000.
73. Chung, K.T. and M.A. McCrae, *Regulation of gene expression by the NSP1 and NSP3 non-structural proteins of rotavirus*. Arch Virol, 2011. **156**(12): p. 2197 -203.
74. Kattoura, M.D., X. Chen, and J.T. Patton, *The rotavirus RNA-binding protein NS35 (NSP2) forms 10S multimers and interacts with the viral RNA polymerase*. Virology, 1994. **202**(2): p. 803 -13.
75. Piron, M., et al., *Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F*. EMBO J, 1998. **17**(19): p. 5811 -21.
76. Gonzalez, R.A., et al., *In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins*. Arch Virol, 1998. **143**(5): p. 981 -96.
77. O'Brien, J.A., J.A. Taylor, and A.R. Bellamy, *Probing the structure of rotavirus NSP4: a short sequence at the extreme C terminus mediates binding to the inner capsid particle*. J Virol, 2000. **74**(11): p. 5388 -94.
78. Iturriza-Gomara, M., et al., *Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 and VP6 proteins in common and reassortant human rotavirus strains*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(8): p. 3566 -73.
79. Berois, M., et al., *Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2*. J Virol, 2003. **77**(3): p. 1757 -63.
80. Ramig, R.F., *Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection*. J Virol, 2004. **78**(19): p. 10213 -20.
81. Lopez, S. and C.F. Arias, *Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance*. Trends Microbiol, 2004. **12**(6): p. 271 -8.

82. Ciarlet, M., et al., *VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment*. J Virol, 2002. **76**(3): p. 1109 -23.
83. Ciarlet, M. and M.K. Estes, *Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt **4**) : p. 943-8.
84. Guerrero, C.A., et al., *Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14644 -9.
85. Graham, K.L., et al., *Rotaviruses interact with alpha4beta7 and alpha4beta1 integrins by binding the same integrin domains as natural ligands*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 12): p. 3397-408.
86. Guerrero, C.A., et al., *Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 4096 -102.
87. Gualtero, D.F., et al., *Amino acid domains 280-297 of VP6 and 531-554 of VP4 are implicated in heat shock cognate protein hsc70-mediated rotavirus infection*. Arch Virol, 2007. **152**(12): p. 2183 -96.
88. Zarate, S., et al., *Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5*. J Virol, 2003. **77**(13): p. 7254-60.
89. Guerrero, C.A. and L.P. Moreno, *Rotavirus receptor proteins Hsc70 and integrin alphavbeta3 are located in the lipid microdomains of animal intestinal cells*. Acta Virol, 2012. **56**(1): p. 63 -70.
90. Calderon, M.N., et al., *Inhibiting rotavirus infection by membrane-impermeant thiol/disulfide exchange blockers and antibodies against protein disulfide isomerase*. Intervirology, 2012. **55**(6): p. 451 -64.
91. Santana, A.Y., C.A. Guerrero, and O. Acosta, *Implication of Hsc70, PDI and integrin alphavbeta3 involvement during entry of the murine rotavirus ECwt into small-intestinal villi of suckling mice*. Arch Virol, 2013. **158**(6): p. 1323 -36.
92. Ludert, J.E., et al., *Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells*. Intervirology, 1987. **27**(2): p. 95-101.
93. Chemello, M.E., et al., *Requirement for vacuolar H⁺ -ATPase activity and Ca²⁺ gradient during entry of rotavirus into MA104 cells*. J Virol, 2002. **76**(24): p. 13083 -7.
94. Superti, F., et al., *Induction of apoptosis in HT-29 cells infected with SA-11 rotavirus*. J Med Virol, 1996. **50**(4): p. 325 -34.
95. Castilho, J.G., et al., *The in vitro cytopathology of a porcine and the simian (SA -11) strains of rotavirus*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004. **99**(3): p. 313 -7.
96. Perez, J.F., et al., *Oncosis in MA104 cells is induced by rotavirus infection through an increase in intracellular Ca²⁺ concentration*. Virology, 1998. **252**(1): p. 17 -27.

97. Martin-Latil, S., et al., *Bax is activated during rotavirus-induced apoptosis through the mitochondrial pathway*. J Virol, 2007. **81**(9): p. 4457 -64.
98. Chaibi, C., et al., *Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells*. Virology, 2005. **332**(2): p. 480 -90.
99. Bhowmick, R., et al., *Rotaviral enterotoxin nonstructural protein 4 targets mitochondria for activation of apoptosis during infection*. J Biol Chem, 2012. **287**(42): p. 35004 -20.
100. Halasz, P., G. Holloway, and B.S. Coulson, *Death mechanisms in epithelial cells following rotavirus infection, exposure to inactivated rotavirus or genome transfection*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 8): p. 2007 -18.
101. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853 -66.
102. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
103. Chen, F.E. and G. Ghosh, *Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6845 -52.
104. Perkins, N.D., *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 49 -62.
105. Hatada, E.N., et al., *The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(6): p. 2489 -93.
106. Huang, T.T., et al., *A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1014 -9.
107. Israel, A., *The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(3): p. a000158.
108. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(6) : p. 280-8.
109. Karin, M., et al., *NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 301 -10.
110. Karin, M. and A. Lin, *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 221 -7.
111. Koch, A.E., et al., *Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis*. Science, 1992. **258**(5089): p. 1798 -801.
112. Gilmore, T.D., *Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 692 5-37.
113. Keates, S., et al., *Helicobacter pylori infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells*. Gastroenterology, 1997. **113**(4): p. 1099 -109.

114. Dickinson, B.C. and C.J. Chang, *Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses*. Nat Chem Biol, 2011. **7**(8): p. 504 -11.
115. Morgan, M.J. and Z.G. Liu, *Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 103 -15.
116. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 1 -13.
117. Avshalumov, M.V. and M.E. Rice, *Activation of ATP-sensitive K⁺ (K(ATP)) channels by H₂O₂ underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11729 -34.
118. Sundaresan, M., et al., *Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction*. Science, 1995. **270**(5234): p. 296 -9.
119. Higinbotham, K.G., et al., *GGT to GTT transversions in codon 12 of the K-ras oncogene in rat renal sarcomas induced with nickel subsulfide or nickel subsulfide/iron are consistent with oxidative damage to DNA*. Cancer Res, 1992. **52**(17): p. 4747 -51.
120. Waris, G. and H. Ahsan, *Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions*. J Carcinog, 2006. **5**: p. 14.
121. Jaiyesimi, I.A., A.U. Buzdar, and G. Hortobagyi, *Inflammatory breast cancer: a review*. J Clin Oncol, 1992. **10**(6): p. 1014 -24.
122. Malins, D.C. and R. Haimanot, *Major alterations in the nucleotide structure of DNA in cancer of the female breast*. Cancer Res, 1991. **51**(19): p. 5430 -2.
123. McBride, T.J., B.D. Preston, and L.A. Loeb, *Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals*. Biochemistry, 1991. **30**(1): p. 207 -13.
124. Saito, Y., et al., *Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide*. Free Radic Res, 2006. **40**(6): p. 619 -30.
125. Li, Y., et al., *Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase*. Nat Genet, 1995. **11**(4): p. 376 -81.
126. Elchuri, S., et al., *CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life*. Oncogene, 2005. **24**(3): p. 367 -80.
127. Kumari, M.V., M. Hiramatsu, and M. Ebadi, *Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II*. Free Radic Res, 1998. **29**(2): p. 93 -101.
128. Dinkova-Kostova, A.T. and P. Talalay, *NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector*. Arch Biochem Biophys, 2010. **501**(1): p. 116 -23.
129. Marnett, L.J., et al., *Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 22903 -6.
130. Pineda-Molina, E., et al., *Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding*. Biochemistry, 2001. **40**(47): p. 14134 -42.

131. Matthews, J.R., et al., *Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(12): p. 2236 -42.
132. Gloire, G. and J. Piette, *Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF-kappaB activation*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(9): p. 2209 -22.
133. Canty, T.G., Jr., et al., *Oxidative stress induces NF-kappaB nuclear translocation without degradation of I kappa B alpha*. Circulation, 1999. **100**(19 Suppl): p. II361 -4.
134. Fan, C., et al., *Tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha activates NF kappa B through a redox-regulated and c-Src-dependent mechanism following hypoxia/reoxygenation*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 2072 -80.
135. Imbert, V., et al., *Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha*. Cell, 1996. **86**(5): p. 787 -98.
136. Lluís, J.M., et al., *Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling: activation of nuclear factor-kappaB via c-SRC and oxidant-dependent cell death*. Cancer Res, 2007. **67**(15): p. 7368 -77.
137. Beraud, C., W.J. Henzel, and P.A. Baeuerle, *Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF-kappaB activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 429 -34.
138. Panopoulos, A., et al., *Iron-mediated H2O2 production as a mechanism for cell type-specific inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced but not interleukin-1beta-induced I kappa B kinase complex/nuclear factor-kappaB activation*. J Biol Chem, 2005. **280**(4): p. 2912-23.
139. Reynaert, N.L., et al., *Dynamic redox control of NF-kappaB through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory kappaB kinase beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(35): p. 13086 -91.
140. Herscovitch, M., et al., *Intermolecular disulfide bond formation in the NEMO dimer requires Cys54 and Cys347*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **367**(1): p. 103 -8.
141. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell Death Differ, 2009. **16**(1): p. 3 -11.
142. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239 -57.
143. Tait, S.W. and D.R. Green, *Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(9): p. 621 -32.
144. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 231 -41.
145. Vandenabeele, P., et al., *Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(10) : p. 700-14.

146. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 47 -59.
147. Fadeel, B., et al., *Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **266**(2): p. 504 -11.
148. Lee, S.H., et al., *Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm*. Cell Death Differ, 2013. **20**(1): p. 64-76.
149. Suzuki, M., R.J. Youle, and N. Tjandra, *Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization*. Cell, 2000. **103**(4): p. 645 -54.
150. Griffiths, G.J., et al., *Cellular damage signals promote sequential changes at the N-terminus and BH-1 domain of the pro-apoptotic protein Bak*. Oncogene, 2001. **20**(52): p. 7668 -76.
151. Cassidy-Stone, A., et al., *Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization*. Dev Cell, 2008. **14**(2): p. 193 -204.
152. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 420 -30.
153. Ricci, J.E., et al., *Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain*. Cell, 2004. **117**(6): p. 773 -86.
154. Golstein, P. and G. Kroemer, *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(1): p. 37 -43.
155. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. Cell, 2003. **114**(2): p. 181 -90.
156. Lin, Y., et al., *Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(19): p. 2514 -26.
157. Los, M., et al., *Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(3): p. 978 -88.
158. Moubarak, R.S., et al., *Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(13): p. 4844 -62.
159. Polster, B.M., et al., *Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria*. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 6447 -54.
160. Schulze-Osthoff, K., et al., *Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation*. J Biol Chem, 1992. **267**(8): p. 5317 -23.

161. Zhang, D.W., et al., *RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis*. *Science*, 2009. **325**(5938): p. 332 -6.
162. Kim, Y.S., et al., *TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death*. *Mol Cell*, 2007. **26**(5): p. 675-87.
163. Benedetti, A., M. Comporti, and H. Esterbauer, *Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids*. *Biochim Biophys Acta*, 1980. **620**(2): p. 281 -96.
164. Davis, C.W., et al., *Nitration of the mitochondrial complex I subunit NDUFB8 elicits RIP1- and RIP3-mediated necrosis*. *Free Radic Biol Med*, 2010. **48**(2): p. 306 -17.
165. Feder, M.E. and G.E. Hofmann, *Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology*. *Annu Rev Physiol*, 1999. **61**: p. 243-82.
166. Trepel, J., et al., *Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(8): p. 537 -49.
167. Sidera, K. and E. Patsavoudi, *Extracellular HSP90: conquering the cell surface*. *Cell Cycle*, 2008. **7**(11): p. 1564 -8.
168. Becker, B., et al., *Induction of Hsp90 protein expression in malignant melanomas and melanoma metastases*. *Exp Dermatol*, 2004. **13**(1): p. 27 -32.
169. Echeverria, P.C. and D. Picard, *Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1803**(6): p. 641-9.
170. Maloney, A., et al., *Gene and protein expression profiling of human ovarian cancer cells treated with the heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin*. *Cancer Res*, 2007. **67**(7): p. 3239 -53.
171. Hamamoto, R., et al., *SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells*. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(8): p. 731 -40.
172. Sekimoto, T., et al., *The molecular chaperone Hsp90 regulates accumulation of DNA polymerase η at replication stalling sites in UV-irradiated cells*. *Mol Cell*, 2010. **37**(1): p. 79-89.
173. Schupp, M. and M.A. Lazar, *Endogenous ligands for nuclear receptors: digging deeper*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(52): p. 40409 -15.
174. Peters, J.M., Y.M. Shah, and F.J. Gonzalez, *The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(3): p. 181 -95.
175. Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor*. *Cell*, 1994. **79**(7): p. 1147 -56.
176. Ricote, M., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation*. *Nature*, 1998. **391**(6662): p. 79 -82.

177. Semple, R.K., V.K. Chatterjee, and S. O'Rahilly, *PPAR gamma and human metabolic disease*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 581 -9.
178. Nettles, K.W., *Insights into PPARgamma from structures with endogenous and covalently bound ligands*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(9): p. 893 -5.
179. Yang, W.L. and H. Frucht, *Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells*. Carcinogenesis, 2001. **22**(9): p. 1379 -83.
180. Subbaramaiah, K., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): p. 12440-8.
181. Sabichi, A.L., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses cyclooxygenase-2 expression in human prostate cells*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004. **13**(11 Pt 1): p. 1704 -9.
182. Elnemr, A., et al., *PPARgamma ligand (thiazolidinedione) induces growth arrest and differentiation markers of human pancreatic cancer cells*. Int J Oncol, 2000. **17**(6): p. 1157-64.
183. Gupta, R.A., et al., *Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 29681 -7.
184. Huang, J.W., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent ablation of cyclin D1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(4) : p. 1342-8.
185. Qin, C., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists induce proteasome-dependent degradation of cyclin D1 and estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(5): p. 958 -64.
186. Bae, M.A. and B.J. Song, *Critical role of c-Jun N-terminal protein kinase activation in troglitazone-induced apoptosis of human HepG2 hepatoma cells*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(2): p. 401 -8.
187. Zander, T., et al., *Induction of apoptosis in human and rat glioma by agonists of the nuclear receptor PPARgamma*. J Neurochem, 2002. **81**(5): p. 1052 -60.
188. Shiau, C.W., et al., *Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma*. Cancer Res, 2005. **65**(4): p. 1561 -9.
189. Farrow, B. and B.M. Evers, *Activation of PPARgamma increases PTEN expression in pancreatic cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(1): p. 50 -3.
190. Straus, D.S. and C.K. Glass, *Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms*. Trends Immunol, 2007. **28**(12): p. 551 -8.

191. Glass, C.K. and K. Saijo, *Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5) : p. 365-76.
192. Ellgaard, L. and L.W. Ruddock, *The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties*. EMBO Rep, 2005. **6**(1): p. 28 -32.
193. Hogg, P.J., *Disulfide bonds as switches for protein function*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(4): p. 210 -4.
194. Mezghrani, A., et al., *Protein-disulfide isomerase (PDI) in FRTL5 cells. pH -dependent thyroglobulin/PDI interactions determine a novel PDI function in the post-endoplasmic reticulum of thyrocytes*. J Biol Chem, 2000. **275**(3): p. 1920 -9.
195. Gilbert, H.F., *Protein disulfide isomerase and assisted protein folding*. J Biol Chem, 1997. **272**(47): p. 29399 -402.
196. Klappa, P., et al., *The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins*. EMBO J, 1998. **17**(4): p. 927 -35.
197. Turano, C., et al., *Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions*. J Cell Physiol, 2002. **193**(2): p. 154 -63.
198. Terada, K., et al., *Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes*. J Biol Chem, 1995. **270**(35): p. 20410 -6.
199. Jiang, X.M., et al., *Redox control of exofacial protein thiols/disulfides by protein disulfide isomerase*. J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 2416 -23.
200. Lawrence, D.A., R. Song, and P. Weber, *Surface thiols of human lymphocytes and their changes after in vitro and in vivo activation*. J Leukoc Biol, 1996. **60**(5): p. 611 -8.
201. Tager, M., et al., *Membrane-bound protein disulfide isomerase (PDI) is involved in regulation of surface expression of thiols and drug sensitivity of B-CLL cells*. Exp Hematol, 1997. **25**(7): p. 601 -7.
202. Mandel, R., et al., *Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4112 -6.
203. Ryser, H.J., et al., *Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4559 -63.
204. Abell, B.A. and D.T. Brown, *Sindbis virus membrane fusion is mediated by reduction of glycoprotein disulfide bridges at the cell surface*. J Virol, 1993. **67**(9): p. 5496 -501.
205. Goplen, D., et al., *Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma*. Cancer Res, 2006. **66**(20): p. 9895 -902.
206. Fonseca, C., et al., *Protein disulfide isomerases are antibody targets during immune-mediated tumor destruction*. Blood, 2009. **113**(8): p. 1681 -8.

207. Visvader, J.E., *Cells of origin in cancer*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 314 -22.
208. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563 -72.
209. Superti, F., et al., *HT-29 cells: a new substrate for rotavirus growth*. Arch Virol, 1991. **116**(1 -4): p. 159 -73.
210. Sundstrom, C. and K. Nilsson, *Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U -937)*. Int J Cancer, 1976. **17**(5): p. 565 -77.
211. Morimoto, H., S. Yonehara, and B. Bonavida, *Overcoming tumor necrosis factor and drug resistance of human tumor cell lines by combination treatment with anti-Fas antibody and drugs or toxins*. Cancer Res, 1993. **53**(11): p. 2591 -6.
212. Fadok, V.A., et al., *The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes*. Cell Death Differ, 1998. **5**(7): p. 551 -62.
213. Fadok, V.A., et al., *Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1071 -7.
214. Behrend, L., G. Henderson, and R.M. Zwacka, *Reactive oxygen species in oncogenic transformation*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1441 -4.
215. Yamamoto, T., et al., *Role of catalase in monocytic differentiation of U937 cells by TPA: hydrogen peroxide as a second messenger*. Leukemia, 2009. **23**(4): p. 761 -9.
216. Gupta, R., S. Karpatkin, and R.S. Basch, *Hematopoiesis and stem cell renewal in long-term bone marrow cultures containing catalase*. Blood, 2006. **107**(5): p. 1837 -46.
217. Oka, S., et al., *Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs*. EMBO J, 2008. **27**(2): p. 421 -32.
218. Parsons, J.L., et al., *Poly(ADP -ribose) polymerase -1 protects excessive DNA strand breaks from deterioration during repair in human cell extracts*. FEBS J, 2005. **272**(8): p. 2012-21.
219. McKinnon, P.J. and K.W. Caldecott, *DNA strand break repair and human genetic disease*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2007. **8**: p. 37-55.
220. Schreiber, V., et al., *Poly(ADP -ribose): novel functions for an old molecule*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(7): p. 517 -28.
221. Kordes, U., et al., *Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells*. Leukemia, 2000. **14**(3): p. 399 -402.
222. Maruri-Avidal, L., S. Lopez, and C.F. Arias, *Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles*. J Virol, 2008. **82**(11): p. 5368 -80.
223. Guerrero, R., *Evaluación del potencial oncolítico del rotavirus en la línea celular de cáncer de mieloma murino sp2/0-ag14*. Tesis maestría en bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia.

224. Gomez, D., *Expresión de las proteínas PPARgamma y nuclear factor-kappaB en vellosidades intestinales de ratones adultos ICR infectados con rotavirus ECwt y tratados con pioglitazona*. Tesis maestría en bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia.
225. Silva, E., *Evaluación del potencial oncolítico del rotavirus en la línea celular de linfoma Histiocítico U937*. Tesis maestría en genética. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla: Porcentajes de infección de antígenos virales, evaluando proteínas estructurales y estructurales mediante inmunocitoquímica

TRATAMIENTO	% INFECCIÓN CÉLULAS REH				% INFECCIÓN CÉLULAS U937			
	N	M (%)	SD	S	N	M (%)	SD	S
1	4	18,880	1,771	*	4	20.400	1,300	***
3	4	33,445	2,793	***	4	30,600	7,357	***
5	4	46,200	4,766	***	4	43.950	4,950	***
7	4	47,110	5,317	***	4	53,125	5,202	***
9	4	64,125	5,834	***	4	61,540	3,338	***
11	4	73,845	2,044	***	4	73,100	2,295	***
NO INFECTADAS	4	0,005	0,007		4	0,008	0,009	

Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Dunnett para los resultados de la figura 3. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y de manera simultánea con algunos de los diferentes ensayos efectuados. Al finalizar todos los experimentos se promediaron todos los porcentajes encontrados en cada análisis. El valor de las diferentes h.p.i. se contrasta contra las células no infectadas. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 2

Tabla: Porcentajes de células de las líneas REH y U937 con alteración de la membrana citoplasmática evaluadas con Anexina V y 7-aminoactinomicin D (7-AAD)

TRATAMIENTO	% células REH positivas para ANEXINA V								% células U937 positivas para ANEXINA V										
	SIN INFECTAR			INFECTADAS			Valor de p		S		SIN INFECTAR			INFECTADAS			Valor de p		S
HORAS POST INFECCIÓN	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	Valor de p	S	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	Valor de p	S			
0,25	4	0,550	0,071	4	0,600	0,212	1,0000	ns	4	5,870	1,937	4	6,000	1,838	0,9514	ns			
3	4	2,200	0,990	4	7,300	0,424	0,0216	*	4	6,600	0,141	4	8,400	1,131	0,1552	ns			
7	4	2,600	1,414	4	10,550	2,192	0,0498	*	4	6,750	0,212	4	7,840	1,117	0,3080	ns			
11	4	4,250	1,909	4	27,200	2,546	0,0154	*	4	3,860	0,651	4	21,790	0,085	0,0007	***			
	% células REH positivas para 7AAD								% células U937 positivas para 7 AAD										
0,25	4	1,400	0,141	4	1,850	0,071	0,0565	ns	4	3,180	1,952	4	3,180	1,952	1,0000	ns			
3	4	4,950	0,354	4	8,050	0,495	0,0187	*	4	6,185	1,577	4	7,795	0,643	0,3130	ns			
7	4	3,450	1,202	4	10,050	1,202	0,0316	*	4	10,445	4,207	4	18,685	0,898	0,1135	ns			
11	4	9,700	1,556	4	17,250	3,606	0,0708	ns	4	19,590	4,497	4	29,995	5,325	0,1692	ns			

Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 4. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: Células sin infectar en cada una de las h.p.i.. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 3

a, Tabla: Porcentajes de células de las líneas REH y U937 con fragmentación del DNA evaluadas mediante tinción de Hoescht. (Comparación células a diferentes h.p.i. vs no infectadas)

TRATAMIENTO	HOESCHT CÉLULAS REH				HOESCHT CÉLULAS U937			
	N	M (%)	SD	S	N	M (%)	SD	S
1	4	9,650	0,071	ns	4	16,500	4,101	ns
3	4	29,150	4,738	***	4	33,550	6,223	***
5	4	40,450	2,333	***	4	50,100	10,889	***
7	4	44,600	3,536	***	4	67,600	5,657	***
9	4	69,399	7,495	***	4	78,950	2,051	***
11	4	82,400	1,556	***	4	84,800	1,838	***
NO INFECTADAS	4	6,250	1,202		4	3,400	0,141	
No Inf +H ₂ O ₂	4	89,600	3,677	***		89,000	4,384	***

Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Dunnett para los resultados de la figura 5. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. El valor de las diferentes h.p.i. se contrasta contra las células no infectadas. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

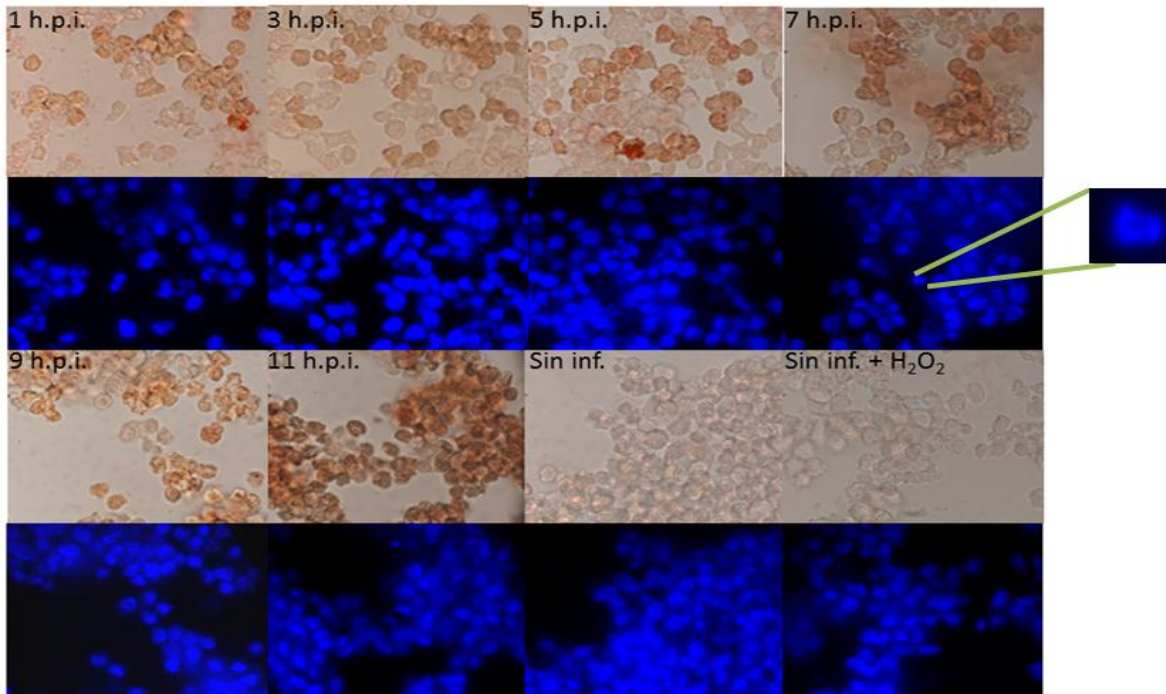
b, Tabla: Porcentajes de células de las líneas REH y U937 con fragmentación del DNA evaluadas mediante tinción de Hoescht. (Comparación del valor de cada h.p.i. vs la h.p.i. anterior)

TRATAMIENTO	HOESCHT CÉLULAS Reh				HOESCHT CÉLULAS U937			
	N	M	SD	S	N	M	SD	S
1	4	9,650	0,071	ns	4	16,500	4,101	ns
3	4	29,150	4,738	**	4	33,550	6,223	*
5	4	40,450	2,333	ns	4	50,100	10,889	*
7	4	44,600	3,536	ns	4	67,600	5,657	*
9	4	69,399	7,495	**	4	78,950	2,051	ns
11	4	82,400	1,556	ns	4	84,800	1,838	ns
NO INFECTADAS	4	6,250	1,202		4	3,400	0,141	
No Inf +H ₂ O ₂	4	89,600	3,677	***	4	89,000	4,384	***

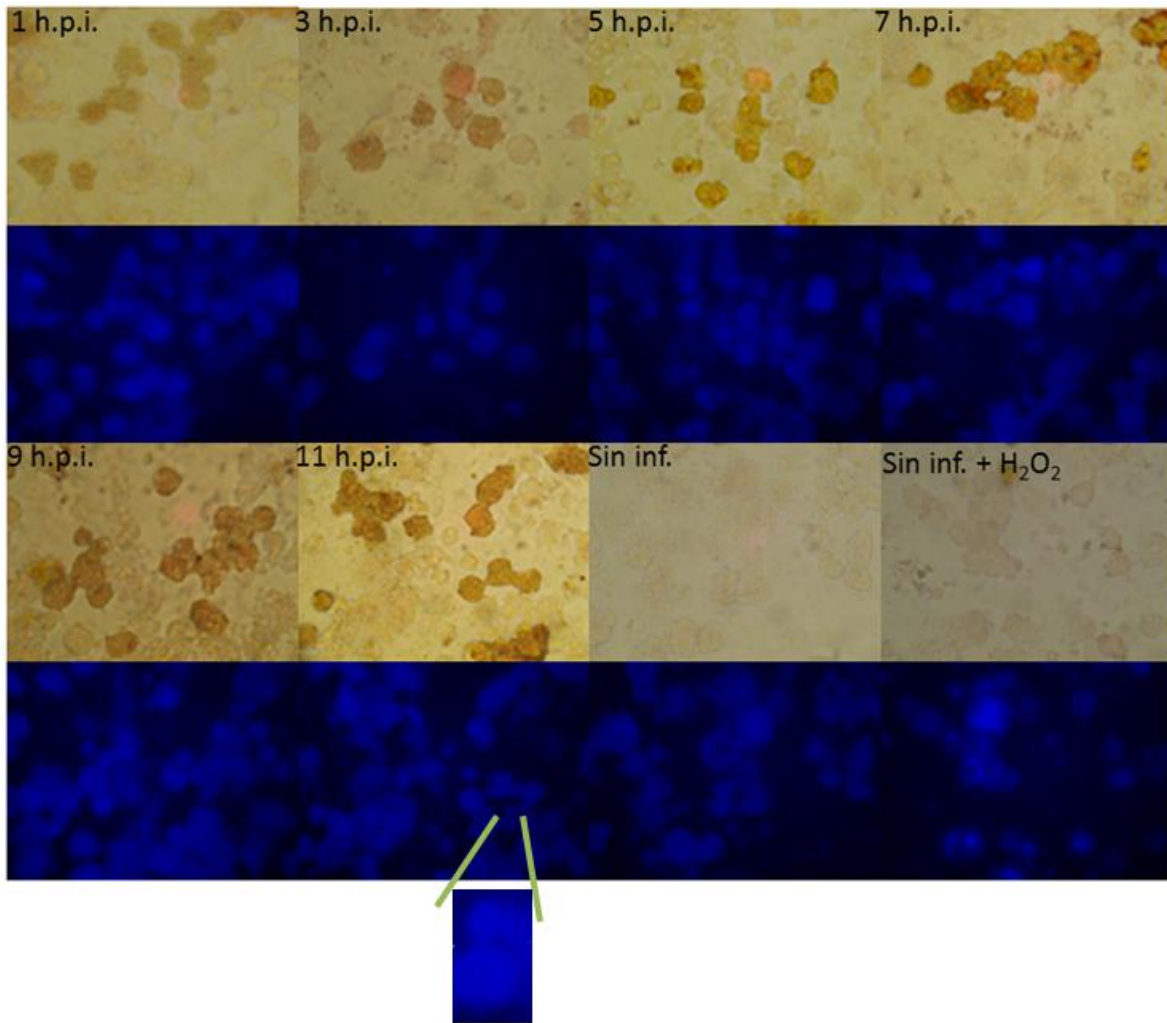
Tabla 3. Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 5. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. El valor de cada h.p.i. se contrasta la h.p.i. anterior, la 1 h.p.i. contra las células no infectadas. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 4

a, Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus en células REH infectadas con rotavirus WTEW e inmunofluorescencia de cambios en el patrón de distribución de la cromatina evaluado con Hoescht a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i.



b, Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus en células U937 infectadas con rotavirus WTEW e inmunofluorescencia de cambios en el patrón de distribución de la cromatina evaluado con Hoescht a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i.



ANEXO 5

a, Tabla: Porcentajes de células de las líneas REH y U937 con fragmentación del DNA evaluadas mediante tinción Ioduro de propidio (Comparación células a diferentes h.p.i. vs no infectadas)

TRATAMIENTO	IODURO DE PROPIDIO CÉLULAS REH				IODURO DE PROPIDIO CÉLULAS U937			
	N	M (%)	SD	S	N	M (%)	SD	S
1	4	18,800	4,384	*	4	16,500	5,798	ns
3	4	35,000	6,788	***	4	30,500	4,525	**
5	4	46,050	4,879	***	4	38,200	4,384	**
7	4	60,800	3,111	***	4	50,150	8,980	***
9	4	44,850	0,255	***	4	51,510	6,067	***
11	4	88,200	0,141	***	4	88,950	6,010	***
NO INFECTADAS	4	4,500	1,697		4	2,500	1,131	
No Inf +H ₂ O ₂	4	90,350	0,354	***		93,200	4,808	***

Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Dunnett para los resultados de la figura 5. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. El valor de las diferentes h.p.i. se contrasta contra las células no infectadas. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

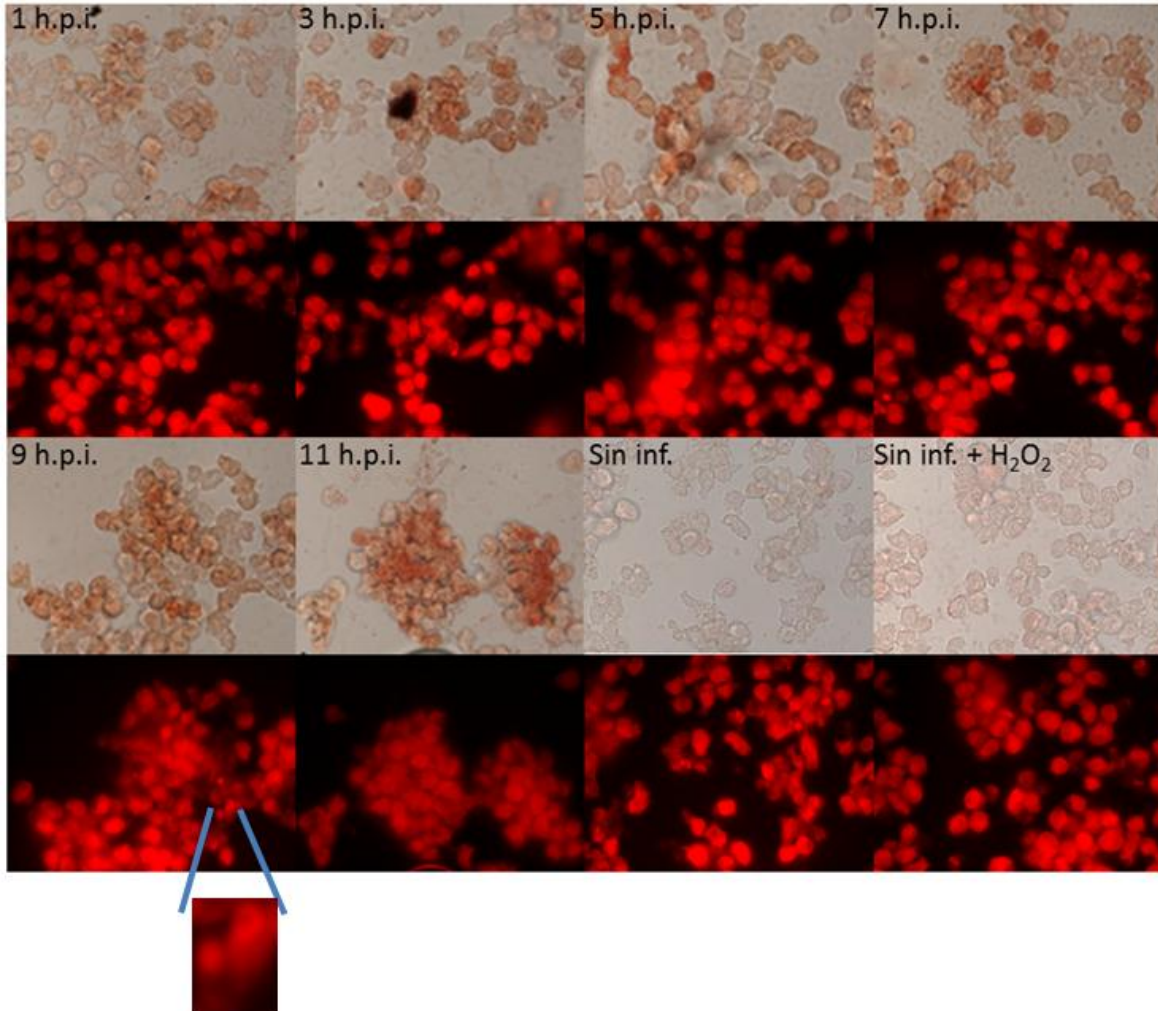
b, Tabla: Porcentajes de células de las líneas REH y U937 con fragmentación del DNA evaluadas mediante tinción Ioduro de propidio. (Comparación del valor de cada h.p.i. vs la h.p.i. anterior)

TRATAMIENTO	YODURO DE PROPIDIO CÉLULAS REH				YODURO DE PROPIDIO CÉLULAS U937			
	N	M	SD	S	N	M	SD	S
1	4	18,800	4,384	*	4	16,500	5,798	ns
3	4	35,000	6,788	*	4	30,500	4,525	ns
5	4	46,050	4,879	ns	4	38,200	4,384	ns
7	4	60,800	3,111	*	4	50,150	8,980	ns
9	4	44,850	0,255	*	4	51,510	6,067	ns
11	4	88,200	0,141	***	4	88,950	6,010	**
NO INFECTADAS	4	4,500	1,697		4	2,500	1,131	
No Inf +H ₂ O ₂	4	90,350	0,354	***	4	93,200	4,808	***

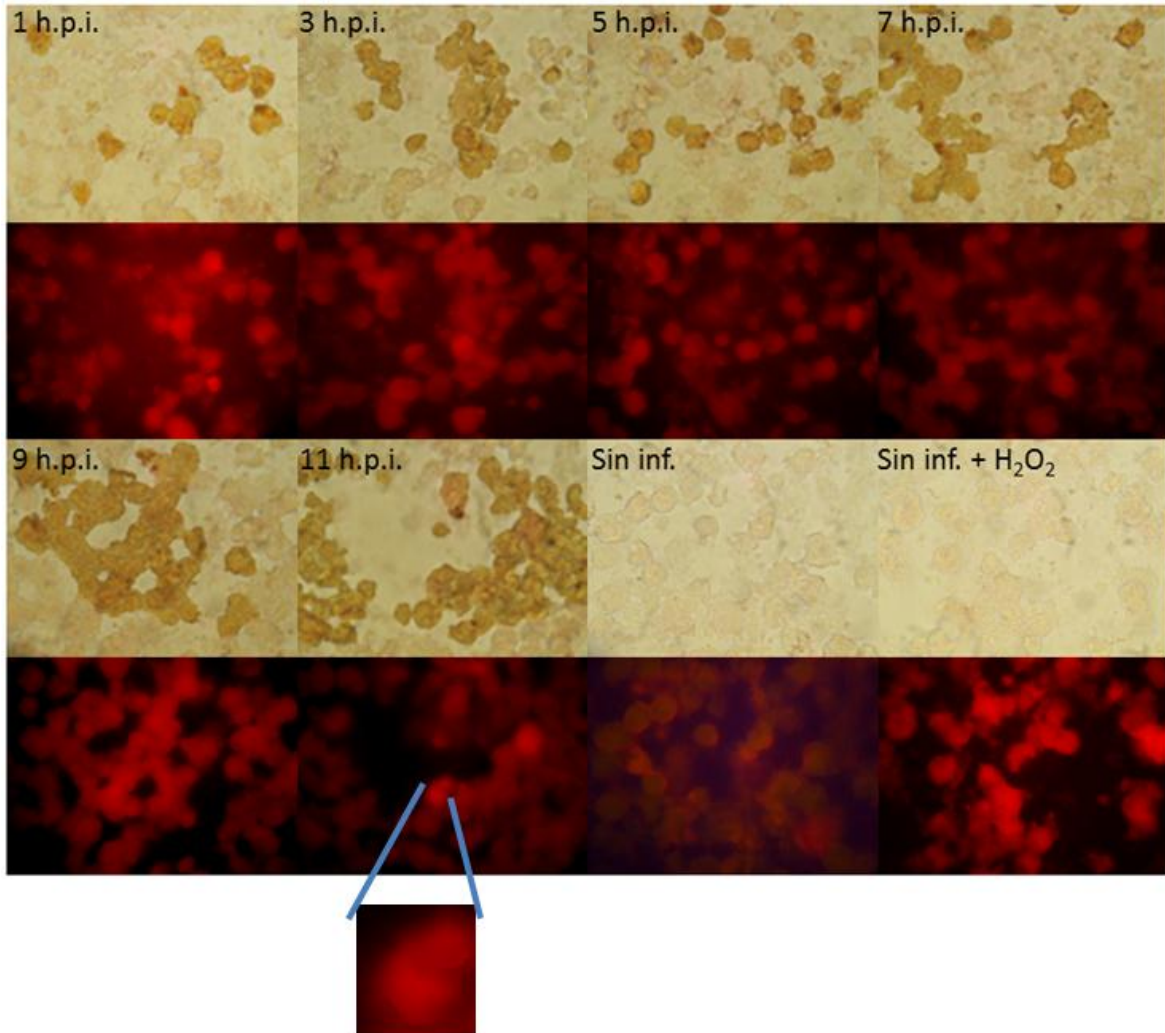
Tabla 4. Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura. ...N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. El valor de cada h.p.i. se contrasta la h.p.i. anterior, la 1 h.p.i. contra las células no infectadas. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 6

a, Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus en células REH infectadas con rotavirus WTEW e inmunofluorescencia de cambios en el patrón de distribución de la cromatina evaluado con Ioduro de propidio a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i.



b, Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus en células U937 infectadas con rotavirus WTEW e inmunofluorescencia de cambios en el patrón de distribución de la cromatina evaluado con Ioduro de propidio a las 1, 3, 5, 7, 9 y 11 h.p.i.



ANEXO 7

Tabla: Porcentajes de células de las líneas REH y U937 con rupturas del DNA evaluadas mediante técnica de TUNEL

TRATAMIENTO	TUNEL CÉLULAS REH								TUNEL CÉLULAS U937										
	SIN INFECTAR			INFECTADAS			Valor de p		S		SIN INFECTAR			INFECTADAS			Valor de p		S
HORAS POST INFECCIÓN	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	Valor de p	S	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	Valor de p	S			
1	4	15,450	0,354	4	22,750	2,220	0,0443	*	4	7,665	0,035	4	16,577	1,092	0,0016	**			
3	4	18,470	3,833	4	42,435	1,747	0,0151	*	4	19,920	0,693	4	27,233	3,496	0,0690	ns			
5	4	16,000	1,838	4	47,185	3,698	0,0087	**	4	15,290	6,491	4	35,923	2,004	0,0117	*			
7	4	18,350	0,212	4	45,520	1,301	0,0012	**	4	19,075	3,854	4	43,277	6,316	0,0180	*			
9	4	19,700	4,243	4	47,625	7,092	0,0411	*	4	19,745	2,751	4	52,105	1,124	0,0042	**			
11	4	18,800	1,131	4	46,220	2,234	0,0041	**	4	20,775	0,955	4	56,223	1,520	<0,0001	***			

Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 6. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: Células sin infectar en cada una de las h.p.i.. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); * = P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 8

Tabla: Porcentajes de células de las líneas REH y U937 con rupturas del DNA y mecanismos de reparación activados evaluados mediante identificación de Poli ADP Ribosa Polimerasa (PARP)

TRATAMIENTO	Poli ADP Ribosa Polimerasa PARP CÉLULAS REH								Poli ADP Ribosa Polimerasa PARP CÉLULAS U937										
	SIN INFECTAR			INFECTADAS			Valor de p		S		SIN INFECTAR			INFECTADAS			Valor de p		S
HORAS POST INFECCIÓN	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	Valor de p	S	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	Valor de p	S			
1	4	18,800	2,121	4	27,440	3,451	0,0946	ns	4	21,080	2,404	4	27,950	4,171	0,1811	ns			
3	4	15,550	0,071	4	35,135	6,131	0,0457	*	4	16,420	1,937	4	32,350	2,388	0,0044	**			
5	4	23,200	1,980	4	40,330	2,305	0,0154	*	4	26,750	1,428	4	37,067	2,829	0,0192	*			
7	4	34,600	3,253	4	44,485	0,120	0,0502	ns	4	28,790	1,570	4	69,857	9,094	0,0092	**			
9	4	41,100	2,546	4	49,325	1,181	0,0536	ns	4	27,545	1,633	4	58,263	4,839	0,0037	**			
11	4	40,950	0,354	4	57,780	1,259	0,0030	**	4	31,905	1,747	4	79,750	4,738	0,0055	**			

Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: Células sin infectar en cada una de las h.p.i.. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); * = P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 9

Tabla: Porcentajes de células de las líneas REH y U937 con potencial de membrana mitocondrial evaluado a través de reactivo DiOC6

TRATAMIENTO	3,3- dihexyloxacarboxyanide iodide (DiOC ₆ (3)) CÉLULAS REH								3,3- dihexyloxacarboxyanide iodide (DiOC ₆ (3)) CÉLULAS U937							
	SIN INFECTAR			INFECTADAS					SIN INFECTAR			INFECTADAS				
HORAS POST INFECCIÓN	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	Valor de p	S	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	Valor de p	S
0,25	4	98,700	1,838	4	98,700	1,838	1,0000	ns	4	94,050	0,636	4	94,050	0,636	1,0000	ns
3	4	96,350	1,344	4	85,600	0,283	0,0081	**	4	89,550	0,495	4	79,700	3,111	0,0475	*
7	4	84,400	4,384	4	82,050	4,737	0,6579	ns	4	74,350	4,879	4	64,350	6,010	0,2093	ns
11	4	84,400	0,141	4	70,550	4,455	0,0481	*	4	80,100	0,141	4	41,050	1,909	0,0581	**
No inf + H₂O₂	4	19,430	4,342						4	31,700	5,020					

Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 7. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: Células sin infectar en cada una de las h.p.i.. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 10

a, Tabla: Porcentaje de Supervivencia en células de las líneas REH y U937 mediante ensayo de MTT (Comparación células a diferentes h.p.i. vs no infectadas)

TRATAMIENTO	MTT CÉLULAS REH				MTT CÉLULAS U937			
	N	M (%)	SD	S	N	M (%)	SD	S
3	4	77,500	3,535	***	4	71,660	1,513	***
5	4	68,030	6,657	**	4	70,120	4,186	***
7	4	74,540	2,065	**	4	68,870	1,600	***
9	4	68,105	3,854	**	4	78,175	0,559	***
11	4	71,215	2,143	**	4	51,500	4,950	**
No Inf +H₂O₂	4	46,965	2,143			35,000	0,014	

Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Dunnett para los resultados de la figura 7. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. El valor de cada h.p.i. se contrasta contra las células no infectadas y tratadas con H₂O₂. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); * = P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

b, Tabla: Porcentaje de Supervivencia en células de las líneas REH y U937 mediante ensayo de MTT (Comparación del valor de cada h.p.i. vs la h.p.i. anterior)

TRATAMIENTO	MTT CÉLULAS REH				MTT CÉLULAS U937			
	N	M	SD	S	N	M	SD	S
3	4	77,500	3,535		4	71,660	1,513	
5	4	68,030	6,657	ns	4	70,120	4,186	ns
7	4	74,540	2,065	ns	4	68,870	1,600	ns
9	4	68,105	3,854	ns	4	78,175	0,559	ns
11	4	71,215	2,143	ns	4	51,500	4,950	***
No Inf +H₂O₂	4	46,965	2,143		4	35,000	0,014	

Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura. ...N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. El valor de cada h.p.i. se contrasta la h.p.i. anterior. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); * = P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 11

Tabla: Porcentaje de Supervivencia en células de las líneas REH y U937 mediante ensayo con Resazurina

TRATAMIENTO	RESAZURINA CÉLULAS REH				RESAZURINA CÉLULAS U937			
	N	M (%)	SD	S	N	M (%)	SD	S
3	4	95,060	3,394	***	4	91,940	2,390	**
5	4	89,775	3,854	***	4	87,655	7,927	**
7	4	88,965	3,019	***	4	96,270	0,877	***
9	4	72,405	3,472	***	4	68,740	0,948	ns
11	4	76,145	3,330	***	4	70,960	8,740	ns
27	4	86,140	5,190	***	4	94,180	4,780	***
No Inf +H ₂ O ₂	4	44,120	1,160		4	58,215	0,742	

Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Dunnett para los resultados de la figura 7. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. El valor de cada h.p.i. se contrasta contra las células no infectadas y tratadas con H₂O₂. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); * = P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 12

Tabla: Porcentaje de Supervivencia en células de las líneas REH y U937 infectadas con rotavirus WTEW a diferentes MOI 10, 4 y 2 mediante ensayo con Resazurina

TRATAMIENTO	RESAZURINA CÉLULAS REH							
	7				11			
HORAS POST INFECCION	N	M (%)	SD	S	N	M (%)	SD	S
DILUCIONES								
MOI 10	4	79,165	2,949	ns	4	44,120	1,160	**
MOI 4	4	85,940	0,735	ns	4	58,170	3,536	*
MOI 2	4	88,965	3,019		4	76,145	3,330	
TRATAMIENTO	RESAZURINA CÉLULAS U937							
	7				11			
HORAS POST INFECCION	N	M (%)	SD	S	N	M (%)	SD	S
DILUCIONES								
MOI 10	4	57,725	4,490	**	4	45,115	4,122	*
MOI 4	4	61,280	2,348	**	4	49,525	0,262	*
MOI 2	4	96,270	0,877		4	70,960	4,497	

Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 7. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. El valor de la dilución 1:5 se contrasta contra los valores obtenidos en las diluciones 1:25 y 1:50. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); * = P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 13

Tabla: Porcentaje de células de las líneas REH y U937 positivas para ROS evaluado mediante el kit Cellomics® Oxidative Stress I

TRATAMIENTO	Especies Reactivas de Oxígeno ROS CÉLULAS REH								Especies Reactivas de Oxígeno ROS CÉLULAS U937							
	SIN INFECTAR			INFECTADAS					SIN INFECTAR			INFECTADAS				
HORAS POST INFECCIÓN	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	Valor de p	S	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	Valor de p	S
1	4	14,685	4,269	4	34,945	1,209	0,0425	*	4	32,120	1,146	4	45,510	1,047	0,0066	**
3	4	19,865	3,868	4	30,775	3,995	0,1260	ns	4	41,850	0,071	4	46,195	2,029	0,0941	ns
5	4	22,000	1,838	4	33,230	0,523	0,0142	*	4	43,905	0,884	4	59,370	2,036	0,0101	*
7	4	22,250	2,192	4	41,205	0,573	0,0071	**	4	49,975	1,407	4	57,125	0,912	0,0264	*
9	4	24,650	1,343	4	49,695	4,674	0,0183	*	4	54,000	0,537	4	68,450	2,008	0,0102	*
11	4	30,800	1,980	4	43,160	0,368	0,0130	*	4	59,240	0,962	4	44,100	1,994	0,0105	*

Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 8. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: Células sin infectar en cada una de las h.p.i.. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 14

Tabla: Porcentaje de células positivas para ROS de las líneas REH y U937 infectadas con rotavirus WTEW y tratadas con NAC o Inhibidores de la vía NFκB

TRATAMIENTO	ROS CÉLULAS REH				ROS CÉLULAS U937			
	N	M (%)	SD	S	N	M (%)	SD	S
No infectadas	4	24,650	1,980		4	54,000	0,537	
Infectadas	4	58,500	0,990	***	4	72,400	4,384	*
Tiazolidinediona	4	42,350	2,051	**	4	42,650	4,031	***
Rosiglitazona	4	51,540	0,339	ns	4	49,700	4,950	**
Pioglitazona	4	60,925	4,900	ns	4	44,950	1,061	**
NAC	4	45,395	2,411	*	4	49,400	2,404	**
Curcumina	4	52,450	2,051	ns	4	51,750	4,455	**

Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 9. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. El valor hallado en células Infectadas se compara con las no infectadas. Luego los valores encontrados en las células infectadas con rotavirus WTEW y tratadas con Tiazolidinediona, Rosiglitazona, Pioglitazona, NAC y Curcumina se contrastan con células infectadas. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 15

Tabla: Porcentaje de infección de antígenos virales en las líneas REH y U937 infectadas con rotavirus WTEW y tratadas con NAC o Inhibidores de la vía NFκB

TRATAMIENTO	% INFECCIÓN CÉLULAS REH				% INFECCIÓN CÉLULAS U937			
	N	M (%)	SD	S	N	M (%)	SD	S
No infectadas	4	0,000	0,000		4	0,000	0,000	
Infectadas	4	84,125	5,834	***	4	81,540	3,338	***
Tiazolidinediona	4	49,150	5,162	***	4	43,865	1,351	***
Rosiglitazona	4	51,000	0,283	***	4	47,823	1,114	***
Pioglitazona	4	49,650	1,485	***	4	49,890	2,121	***
NAC	4	48,200	2,404	***	4	48,425	2,482	***
Curcumina	4	48,750	1,626	***	4	52,755	2,694	***

Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 9. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. El valor hallado en células Infectadas se compara con las no infectadas. Luego los valores encontrados en células infectadas con rotavirus WTEW y tratadas con Tiazolidinediona, Rosiglitazona, Pioglitazona, NAC o Curcumina se contrastan con células infectadas. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 16

Tabla: Porcentaje de células de la línea REH infectadas con rotavirus WTEW y tratadas con NAC positivas para proteínas COX, NFκB fosforilado, IKB, PPARγ, PDI y HSP90

TRATAMIENTO	NIVELES DE PROTEINAS CELULARES EN CÉLULAS REH IKB, PPARγ, NFκB, Cox II, HSP90, PDI										
	SIN INFECTAR			INFECTADAS			INF. + NAC			COMPARACIÓN NIVELES DE PROTEINAS	
										INF. VS NO INF.	INF. VS INF + NAC
PROTEÍNAS	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	SIGNIFICANCIA	SIGNIFICANCIA
IKB	4	45,260	2,645	4	54,030	1,824	4	43,990	3,946	ns	ns
PPARγ	4	44,250	1,061	4	50,000	2,786	4	51,745	1,124	ns	ns
NFκB P	4	47,230	3,168	4	61,405	4,405	4	52,135	1,605	*	ns
Cox II	4	35,040	3,422	4	62,660	5,473	4	61,200	0,424	*	ns
HSP90	4	20,180	2,404	4	58,610	4,681	4	53,910	3,974	**	ns
PDI	4	27,315	2,213	4	52,625	0,078	4	51,075	0,445	***	ns
% Infección	4	0,000	0,000	4	64,125	5,834	4	48,200	2,404	***	*

Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 10. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. El valor hallado en células Infectadas con rotavirus WTEW se compara con las no infectadas. Luego los valores encontrados en las células infectadas y tratadas con NAC se contrastan con células infectadas para cada proteína evaluada. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 17

Tabla: Porcentaje de células de la línea U937 infectadas con rotavirus WTEW y tratadas con NAC positivas para proteínas COX, NFκB fosforilado, IKK, PPARγ, PDI y HSP90

TRATAMIENTO	NIVELES DE PROTEINAS CELULARES EN CÉLULAS U937 IKK, PPARγ, NFκB, Cox II, HSP90, PDI										
	SIN INFECTAR			INFECTADAS			INF. + NAC			COMPARACIÓN NIVELES DE PROTEINAS	
										INF. VS NO INF.	INF. VS INF + NAC
PROTEÍNAS	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	SIGNIFICANCIA	SIGNIFICANCIA
IKK	4	30,025	4,264	4	54,280	5,063	4	31,040	4,285	*	*
PPARγ	4	44,500	1,061	4	63,300	3,514	4	52,715	3,514	ns	ns
NFκB P	4	28,500	0,707	4	65,545	2,482	4	46,540	1,824	***	**
Cox II	4	0,005	0,007	4	61,580	0,156	4	51,885	2,666	***	*
HSP90	4	29,655	5,621	4	38,915	3,543	4	28,420	1,358	ns	ns
PDI	4	32,225	2,199	4	58,490	4,511	4	47,740	1,711	**	ns
% Infección	4	0,0500	0,071	4	61,600	3,338	4	52,795	1,534	***	**

Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 10. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. El valor hallado en células Infectadas con rotavirus WTEW se compara con las no infectadas. Luego los valores encontrados en las células infectadas y tratadas con NAC se contrastan con células infectadas para cada proteína evaluada. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 18

Tabla: Porcentaje de células de la línea REH infectadas con rotavirus WTEW y tratadas con NAC con fragmentación nuclear evaluadas mediante tinción Ioduro de propidio, con rupturas del DNA a través de la técnica de TUNEL y mecanismos de reparación activados analizados mediante identificación de Poli ADP Ribosa Polimerasa (PARP)

TRATAMIENTO	Niveles de ioduro de propidio TUNEL Y PARP EN CÉLULAS REH infectadas con Rotavirus WTEW y tratadas con NAC										
	SIN INFECTAR			INFECTADAS			INF. + NAC			COMPARACIÓN NIVELES DE PROTEINAS	
										INF. VS NO INF.	INF. VS INF + NAC
ENSAYO	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	SIGNIFICANCIA	SIGNIFICANCIA
Ioduro de propidio	4	25,500	3,536	4	44,850	0,255	4	36,595	3,387	*	ns
TUNEL	4	24,865	2,143	4	56,420	1,838	4	40,665	0,672	***	**
PARP	4	23,030	4,497	4	42,345	4,547	4	41,905	0,714	*	ns

Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 11. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. El valor hallado en células Infectadas con rotavirus WTEW se compara con las no infectadas. Luego los valores encontrados en las células infectadas y tratadas con NAC se contrastan con células infectadas para cada técnica evaluada. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

ANEXO 19

Tabla: Porcentaje de células de la línea U937 infectadas con rotavirus WTEW y tratadas con NAC con fragmentación nuclear evaluadas mediante tinción Ioduro de propidio, con rupturas del DNA a través de la técnica de TUNEL y mecanismos de reparación activados analizados mediante identificación de Poli ADP Ribosa Polimerasa (PARP)

TRATAMIENTO	Niveles de ioduro de propidio TUNEL Y PARP EN CÉLULAS U937 infectadas con Rotavirus WTEW y tratadas con NAC										
	SIN INFECTAR			INFECTADAS			INF. + NAC			COMPARACIÓN NIVELES DE PROTEINAS	
										INF. VS NO INF.	INF. VS INF + NAC
ENSAYO	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	N	M (%)	SD	SIGNIFICANCIA	SIGNIFICANCIA
Ioduro de propidio	4	19,950	2,475	4	45,805	2,001	4	30,915	3,882	**	*
TUNEL	4	23,390	3,663	4	52,105	1,124	4	45,925	0,474	**	ns
PARP	4	22,255	4,476	4	45,365	4,306	4	30,740	4,426	*	ns

Resumen del tratamiento estadístico por ANOVA de una vía, prueba múltiple de comparación de Tukey para los resultados de la figura 11. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los experimentos fueron realizados por duplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. El valor hallado en células Infectadas con rotavirus WTEW se compara con las no infectadas. Luego los valores encontrados en las células infectadas y tratadas con NAC se contrastan con células infectadas para cada técnica evaluada. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).