



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**ESTUDIO PILOTO DE LA ACTIVIDAD ONCOLITICA DEL ROTAVIRUS WTEW EN
UN TUMOR ALOGENICO**

EDUARDO ANIBAL MERINO ORDOÑEZ

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de medicina, departamento de ciencias fisiológicas Cundinamarca

Bogotá, Colombia

2017

**ESTUDIO PILOTO DE LA ACTIVIDAD ONCOLITICA DEL ROTAVIRUS WTEW EN
UN TUMOR ALOGENICO**

EDUARDO ANIBAL MERINO ORDOÑEZ

Proyecto de tesis presentado como requisito parcial para optar al título de

Magister en bioquímica

Director

Carlos Arturo Guerrero Fonseca MD;MSc;PhD

Profesor Titular

Línea de investigación: Virus oncolíticos

Grupo de investigación: Biología molecular de virus

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de medicina, departamento de ciencias fisiológicas

BOGOTA DC

2017

. A mis padres, maestros, amigos y novia

Nacemos ciegos ante la magnificencia del cosmos, más la ciencia es la luz de una nueva mirada y un renacer en la comprensión de todos los fenómenos que nos rodean, es la herramienta que nos permite entender y moldear nuestro universo. Pero como pequeños habitantes de este frágil equilibrio tenemos el deber de usar estos secretos descubiertos para el bien común.

Eduardo Anibal Merino Ordoñez

Agradecimientos

Deseo agradecer a la Universidad Nacional de Colombia por el conocimiento otorgado a lo largo del trayecto por mis estudios de maestría. A mi director de tesis Carlos Arturo Guerrero Fonseca MD;MSc;PhD director de la línea de investigación de Biología Molecular de Virus de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional, quien guio el presente proyecto, ejecutándolo paso a paso en constante revisión de mis avances, y quien otorgó los materiales y laboratorio necesarios para la realización de la presente tesis de maestría.

A mis padres, amigos y novia quienes estuvieron presentes como apoyo moral en cada uno de los altibajos transcurridos en la realización del presente trabajo de maestría.

Resumen

La viroterapia oncolítica es un área de estudio reciente, cuyo fin es ofrecer una alternativa al tratamiento del cáncer, debido a que esta enfermedad ocupa uno de los primeros lugares de mortalidad a nivel mundial. Esta investigación tiene como objetivo determinar la capacidad oncolítica de rotavirus WTEW en tumores alogénicos, generados a partir de células Sp2/0-Ag14, en ratones Balb/c. En el laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Universidad Nacional de Colombia, se han realizado estudios sobre el rotavirus, el cual es un miembro de la familia reoviridae. Dichos estudios han sugerido que el virus tiene tropismo por células tumorales, las cuales tienen como característica la presencia de proteínas de choque térmico, la integrina $\beta 3$, PDI o Erp57. Para esto se determinó la presencia de antígenos rotavirales en tumores alogénicos generados en ratones Balb/c con células Sp2/0-Ag14 por medio de ensayos de Elisa, Western Blot e inmunofluorescencia, por otro lado se determinó la presencia de antígenos relacionados con muerte celular colocalizados con los antígenos rotavirales con los ensayos anteriormente mencionados, en los cuales se obtuvo como resultados una infección de las células tumorales en el modelo alogénico al realizar una inoculación intratumoral y a su vez se logró determinar un aumento en la presencia de antígenos relacionados con muerte celular. Como conclusión del estudio se determinó que el rotavirus WTEW posee la capacidad de infectar células tumorales en el modelo *in vivo* aumentando la presencia de antígenos rotavirales y generando un proceso citoestático en el crecimiento tumoral.

Palabras clave: *In vivo*, modelo alogénico, rotavirus, oncólisis.

Abstract

Oncolytic virotherapy is a recent area of study, whose purpose is to offer an alternative to the treatment of cancer, because this disease occupies one of the first places of mortality worldwide. This research aims to determine the oncolytic capacity of WTEW rotavirus in allogeneic tumors generated from Sp2 / 0-Ag14 cells in Balb / c mice. In the laboratory of Molecular Biology of Virus of the National University of Colombia, studies have been made on the rotavirus, which is a member of the reoviridae family. These studies have suggested that the virus is tropism by tumor cells, which are characterized by the presence of heat shock proteins, $\beta 3$ integrin, PDI or Erp57. For this, the presence of rotaviral antigens in allogeneic tumors generated in Balb / c mice with Sp2 / 0-Ag14 cells was determined by means of Elisa, Western Blot and immunofluorescence assays, on the other hand the presence of antigens related to cell death colocalized with the rotavirus antigens with the aforementioned tests, in which results were obtained an infection of the tumor cells in the allogeneic model when performing an intratumoral inoculation and in turn was possible to determine an increase in the presence of antigens related to cell death . As conclusion of the study it was determined that WTEW rotavirus possesses the ability to infect tumor cells in the in vivo model increasing the presence of rotaviral antigens and generating a cytostatic process in tumor growth.

Key words: In vivo, allogeneic model, rotavirus, oncolysis

Contenido

Resumen	V
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS	IX
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	2
1. CAPÍTULO VIRUS ONCOLÍTICOS.....	2
1.1 Modo de acción de virus oncolíticos	3
1.1.1 HSV-1 (T-VEC)	5
1.1.2 Reovirus	5
1.2 Modelo de ratón en virus oncolíticos	5
2. CAPÍTULO ROTAVIRUS	7
2.1 Características generales del rotavirus	7
2.2 Morfología y Estructura	7
2.2.1 Características de las proteínas virales	8
2.2.1.1 Proteínas estructurales.....	8
2.2.1.2 Proteínas no estructurales.....	9
2.3 Clasificación.....	10
2.4 Epidemiología	10
2.5 Interacción virus-célula: adsorción y penetración	11
2.6 Ciclo replicativo	11
2.7 Riesgos de laboratorio	13
2.8 Receptores celulares de rotavirus	14
2.8.1. Generalidades de la PDI.....	14
2.8.1.1 Estructura de la PDI	14
2.8.1.2 PDI y cáncer	14
2.8.1.3 PDI y rotavirus	15
2.8.2.1 Generalidades de las Integrinas	15
2.8.2.2 Estructura de las integrinas	15
2.8.2.3 Integrina $\alpha V\beta 3$ y cáncer	15
2.8.2.4 integrinas y rotavirus	16

2.8.3.1	Generalidades de las Chaperonas HSPS	16
2.8.3.2	HSPs y cáncer.....	17
2.8.3.3	Hsc 70.....	18
2.8.4	Otros receptores candidatos.....	18
3.	ANTECEDENTES	19
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
5.	JUSTIFICACION.....	20
6.	OBJETIVO GENERAL	21
6.1	OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
7.	HIPOTESIS.....	21
8.	METODOLOGIA.....	21
8.1	Diseño experimental.....	21
8.1.1	Animales virus y reactivos	21
8.1.2	Condiciones ambientales en las que se mantuvo a los ratones.....	22
8.1.3	Obtención del título viral.....	22
8.1.4	Proceso de inmunosupresión, inoculación celular e infección de los ratones y aislamiento de tumor.	22
8.1.5	Inmunocitoquímica de Tumores Aislados.....	23
8.1.6	Fluorescencia.....	24
8.1.7	Western Blot.....	24
8.1.8	Elisa de Captura	24
8.1.9	Ensayo de TUNEL	25
8.1.10	Sujetos de Estudio, Tamaño de Muestra y Recolección.....	25
8.1.11	Procedimientos para Garantizar Aspectos Éticos en las Investigaciones con Animales.....	25
8.1.12	Estadística.....	26
9.	RESULTADOS.....	26
9.1.	El aislamiento Rotaviral WTEW tiene mayor concentración viral respecto a Ecwt y Wt1-5.....	26
9.2.	La infección con la cepa rotaviral WTEW en el modelo in vivo Balb/c SP2 Ag14/0 muestra diferencias en el volumen tumoral pero no en el peso a través de los días.	27
9.3	Hay presencia de antígenos rotavirales en los tumores extraídos del modelo murino Balb/c.....	28
9.4	Los ratones Balb/c Sp2/O-Ag14 tratados con rotavirus WTEW presentan bajo título de anticuerpos.	30
9.5	La presencia de antígenos rotavirales coincide con la expresión de señales de muerte celular.	31
9.6	La infección rotaviral induce muerte celular por degradación de material genético.....	35

10. DISCUSIÒN	37
11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
11.1 Conclusiones	40
11.2 Recomendaciones.....	40
12. ANEXO A: Presencia de antígenos relacionados con muerte celular e infección rotaviral individuales	41
13. BIBLIOGRAFIA	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 modo de acción de los virus oncolíticos:	4
Figura 2 Estructura del rotavirus:	8
Figura 3 Ciclo de replicación del rotavirus	13
Figura 4 Las cepas virales WTEW, Wt1-5 y Ecw1 infectan la línea celular Sp2/o-Ag14.....	¡Error!
Marcador no definido.	
Figura 5 Existen diferencias en el volumen pero no en el peso de los ratones inoculados intratumoralmente con el rotavirus WTEW.	27
Figura 6 Hay presencia de antígenos rotavirales en los tumores del modelo murino	29
Figura 7 Presencia de anticuerpos anti-rotavirus en plasmas sanguíneo del modelo murino.....	31
Figura 8 Presencia de antígenos relacionados con muerte celular en tumores extraídos del modelo murino Balb/c SP2 Ag14/0 infectados y no infectados con virus WTEW.	34
Figura 9 Degradación del material genético en los tumores infectados con el virus WTEW.....	35

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 clasificación serotipos rotavirales	10
Tabla 2 Títulos virales de las cepas rotavirales	27
Tabla 3 pesos de las proteínas rotavirales evaluadas	30
Tabla 4 Medias de inmunofluorescencia	32

INTRODUCCIÓN

Actualmente la viroterapia contra el cáncer es objeto de estudio, ya que puede llegar a ser una herramienta alternativa que complementa el tratamiento anti-tumoral [1, 2]. Un virus oncolítico debe cumplir con ciertas condiciones: 1. Un virus oncolítico debe ser selectivo tumoral, siendo capaz de liberar partículas virales que infecten las células vecinas. 2. Tener potencial citolítico, con baja toxicidad en células no tumorales. 3. Tener la facultad de ser modificado genéticamente. 4. Disponer de control de propagación viral por medio de agentes antivirales. 5. Ser estable genéticamente. 6. Tener inmunidad pre-existente. 7. Poseer sinergia con el sistema inmune o estimulación de la inmunidad antitumoral. Estas condiciones han sido determinadas en distintos virus tales como Reovirus, Adenovirus y virus del Herpes simple [3, 4, 5, 6]. El reovirus al igual que el rotavirus es un virus perteneciente a la familia reoviridae, los cuales son virus no envueltos con morfología icosaédrica y tienen un tamaño de 60 a 80 nm [7, 8, 9].

Actualmente el grupo de investigación de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina, la Universidad Nacional de Colombia ha determinado una permisividad a la infección por rotavirus en distintas líneas tumorales como Caco-2, Kato III, MCF-7, PC-3, U937 y REH [10].

Con la presente investigación se quiso analizar si existe una actividad oncolítica en células de mieloma de ratón SP2/O-Ag14 en un modelo *in vivo* en Ratones Balb/c. Para determinar esta actividad, ratones Balb/c fueron inoculados subdermicamente en el área abdominal con 100 μ L de Pristane. Este reactivo comúnmente se utiliza para precondicionar la cavidad peritoneal de los ratones antes de la inducción del líquido ascítico con células de mieloma para la producción de anticuerpos monoclonales. Al quinto día de aplicado el Pristane los ratones fueron inoculados con 1×10^6 de células SP2/O-Ag14, el ratón se observó diariamente y cuando el tumor sólido formado alcanzó una área de 1.5 cm x 1.5cm, los ratones fueron inoculados con 3 dosis intratumorales de rotavirus en un volumen de 100 μ L y con un título de 3.3×10^8 UFF/ ml. Al tercer día de aplicada la última dosis de rotavirus los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extirpó el tumor, se tomó segmentos del tumor para cortes histológicos y el resto del tumor se disgregó mediante maceración. Las muestras obtenidas fueron analizadas por medio de inmunocitoquímica, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, para los antígenos de rotavirus y antígenos de muerte celular. Los antígenos virales también fueron detectados mediante ensayos de Western blot y Elisa. Para determinar la replicación viral, las células extraídas del tumor fueron lisadas mediante congelamiento y descongelamiento y el lisado obtenido fue sembrado en un cultivo celular durante 12 h a 37 °C. Luego de cosechar las células del cultivo celular, la re-infección fue analizada mediante inmunocitoquímica o inmunofluorescencia y ensayos de ELISA. El suero de estos ratones se analizó en un ensayo de ELISA de captura, utilizando como antígenos rotavirus para determinar la presencia de anticuerpos anti- rotavirus en la sangre de los ratones que desarrollaron tumor y que se les aplicó rotavirus intratumoral.

MARCO TEÓRICO

1. CAPÍTULO VIRUS ONCOLÍTICOS

Los virus oncolíticos son un tratamiento actualmente usado contra el cáncer debido a que tienen la propiedad de replicarse selectivamente en células tumorales, estos virus pueden ser modificados genéticamente para tener secuencias en su genoma que estimulen la inmunidad antitumoral inducida por su infección. Uno de estos virus es el HSV-1, cuyo genoma incluye una secuencia que codifica el factor estimulador de colonia de granulocito-macrofago (GM-CSF), el cual ha dado resultado en el tratamiento contra melanoma en estudios de fase 3, este ha sido usado para el tratamiento de pacientes con melanoma [11].

Se calcula un total de 320,000 virus que tienen la capacidad de infectar células de mamíferos. A nivel tumoral, estos virus pueden tener distintos mecanismos los cuales deben ser estudiados ya que son heterogéneos entre cada uno de ellos. Entre estos se encuentran los receptores celulares del virus y su presencia en células tumorales, la inducción o supresión del sistema inmune y el mecanismo de inducción de muerte celular (sea lisis o latencia) [12].

Los virus oncolíticos han sido investigados como terapia sinérgica a las terapias actuales, con el fin de minimizar los efectos adversos adjuntos a la quimio y radio terapia. Estos últimos no poseen una acción específica sobre las células tumorales sino que a su vez perjudican todas las células del organismo, de esta forma, esta inespecificidad causa efectos perjudiciales en los pacientes o incluso la muerte [13]. Las condiciones necesarias para determinar que un virus es de carácter oncolítico son:

- a. Tener un tropismo en células cáncerosas y no en células normales, valiéndose ya sea de receptores de membrana específicos o de la desregulación del medioambiente intracelular de las células cáncerosas.
- b. Causar muerte de las células cáncerosas debido a la infección.
- c. Impedir la participación de la célula en el progreso de la enfermedad o inducir una respuesta inmune antitumoral.
- d. Propagación dentro del complejo intratumoral e intertumoral [13].

Una de las mayores ventajas que tienen los virus oncolíticos al ser comparada con otras terapias, es la capacidad de infectar y lisar las células tumorales in situ, todo esto debido a la expresión de algunas proteínas de membrana que facilitan la entrada del virus en las células tumorales, sumado a lo anterior estos virus tienen la capacidad de provocar la expresión de señales de peligro en las células huésped provocando así una respuesta inmune antitumoral. Este tipo de tratamiento ofrece ciertas ventajas en ensayos clínicos, tales como la replicación selectiva en células neoplásicas, que resulta en un efecto lítico, ya sea mediado por la misma replicación viral o consecuencia de la expresión de genes que puedan producir efectos citotóxicos endógenos o exógenos, y a su vez una inducción de la inmunidad antitumoral debido a la infección.

Algunos de estos virus tienen la capacidad no solo de entrar en las células tumorales, sino que a su vez pueden entrar en las células normales, aunque las anormalidades de las señales celulares y la homeostasis en las células tumorales, son una ventaja para la replicación viral en este tipo de células [14]. En las células huésped normales, la maquinaria que detecta y aclara las infecciones virales se encuentra íntegra, a

diferencia de las células tumorales donde estos mecanismos están modificados. Por ejemplo, proteínas como PKR están ausentes en las células tumorales mas no en las células normales, permitiendo una mayor replicación viral en las células tumorales debido a la ausencia de respuesta antiviral. Debido a lo anterior, no todos los virus diseñados pueden replicarse en células tumorales, y la heterogeneidad de las proteínas ausentes o presentes en estas células puede mediar la infección viral de manera positiva o negativa. La terapia por medio de virus debe tener en cuenta el mecanismo por el cual este se replica en la célula tumoral y el tipo de respuesta que esta pueda generar ante la infección viral. La respuesta inmune generada por los virus oncolíticos es uno de los problemas a tener en cuenta en este tipo de terapia, pues en primer lugar el virus puede generar la respuesta inmune y potenciar su acción oncolítica al infectar las células tumorales, pero a su vez esta misma respuesta inmune puede evitar la replicación del virus en el resto de las células tumorales [15].

Muchos virus han sido propuestos para estudio como virus oncolíticos entre los cuales se encuentran adenovirus, poxivirus, HSV-1, poliovirus, el virus de Newcastle (NDV), reovirus, entre otros. De los anteriormente citados los virus más usados actualmente son HSV-1, adenovirus y reovirus. El reovirus fue aprobado como tratamiento ante el carcinoma nasofaríngeo a partir del año 2005 [16].

1.1 Modo de acción de virus oncolíticos

Los mecanismos por los cuales los virus oncolíticos son capaces de inducir muerte celular en las células tumorales no están completamente definidos hasta el momento, pues algunos virus tienen la capacidad de atacar distintos tipos de células cancerígenas debido a la presencia de receptores de membrana específicos para estos. De esta manera, el potencial oncolítico de un virus no solo depende del diseño del virus, sino que debe tener en cuenta otras variables, tales como, la dosis, el tipo de virus, el tipo de célula tumoral, la presencia de receptores específicos o inducidos para el virus, y la susceptibilidad de la célula tumoral a algún tipo de muerte celular en específico. En células tumorales los virus oncolíticos pueden tener mayor efecto y mayor replicación debido a la expresión anormal de algunas proteínas implicadas en la respuesta inmune de la célula ante la infección viral. TLR, PKR e IFN son algunas de las rutas adaptativas de las células tumorales usadas para inhibir la apoptosis, posterior a la infección por los virus oncolíticos se ha observado una inducción de muerte celular post infección en las células tumorales, dando como resultado una activación del sistema inmune y muerte celular, siendo la necrosis, la apoptosis y la piroptosis las que tienen mayor presencia en los mecanismos de muerte oncolíticos [17, 18].

Los tumores infectados con estos virus pueden liberar al medio extracelular algunas proteínas y moléculas que pueden potenciar la acción antitumoral del sistema inmune, tales como HMGB1, calreticulina, ATP, ácido úrico y citoquinas como $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, o IL-12, las cuales promueven la maduración de células dendríticas y consecuente respuesta inmune asociada al tumor infectado. Uno de los mayores problemas a los cuales se enfrenta la terapia oncolítica con virus es la distribución del virus tanto en el tejido tumoral como en el organismo debido a que el virus en su mecanismo de infección debe enfrentarse a distintas barreras como necrosis, calcificación, hipoxia, acidosis, actividad proteolítica incrementada, sistema inmune y barreras dimensionales debido al tamaño del virus en sí. De este modo los virus oncolíticos deben estar diseñados para evitar todas estas barreras y poder llegar a las células tumorales de manera efectiva e inducir la muerte de la célula huésped, teniendo en cuenta también que la muerte inducida por el virus permita la replicación del mismo (Figura3) [19].

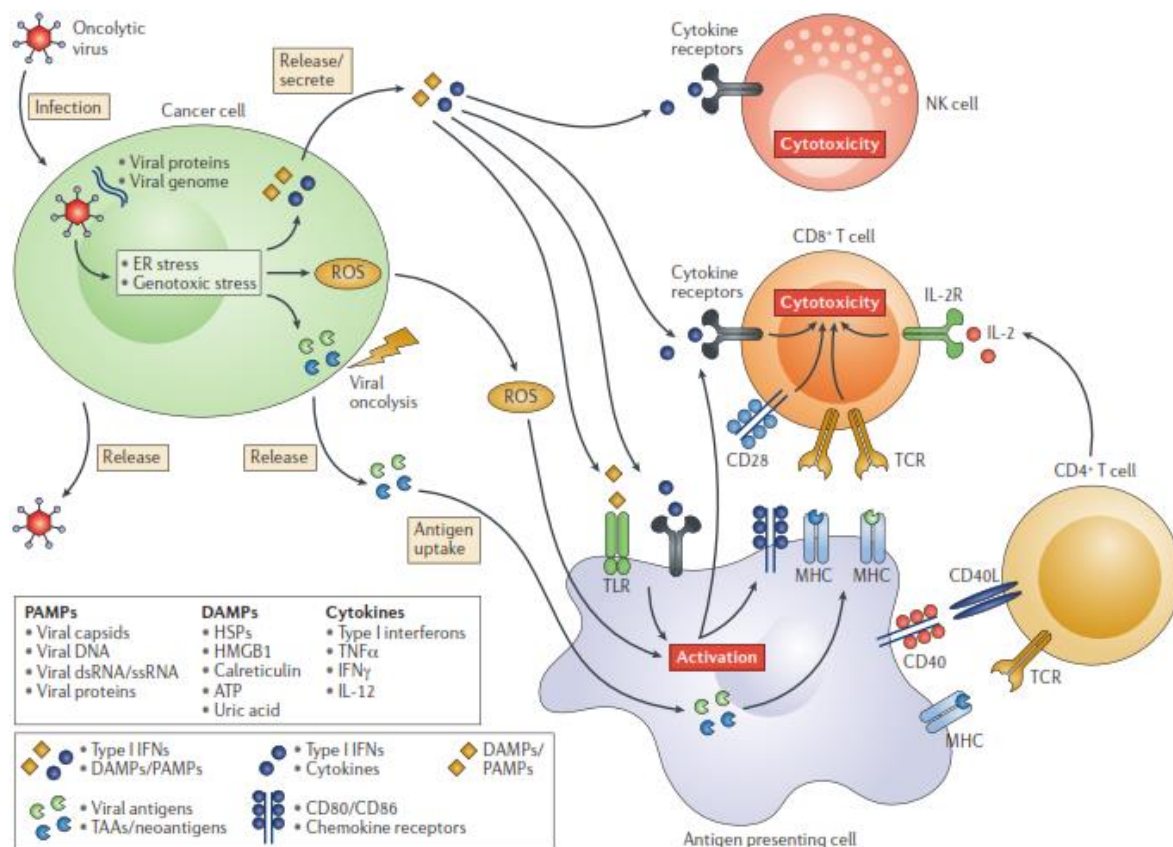


Figura 1 modo de acción de los virus oncolíticos.: Tomado de : *Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drug* [20]

Entre los mecanismos por los cuales los virus oncolíticos son capaces de inducir la muerte celular existen en primera instancia los relacionados con la superficie celular, ya que esta es la primera en tener interacción con el virus; por lo anterior, la presencia de receptores virales son de gran importancia para la internalización del virus y un determinante de la selectividad del virus en las células tumorales. La presencia de estos receptores de membrana o asociados a membrana son clave tanto en la entrada del virus a la célula huésped como en los mecanismos de replicación del mismo en estas células tumorales; uno de estos ejemplos es la proteína RAS la cual se encuentra sobre-expresada en alrededor del 40% de las células tumorales altamente metastásicas y es uno de los blancos por los cuales el reovirus tiene la facilidad de replicarse e inducir oncolisis en las células tumorales que la sobre expresan [21, 3].

Posterior a la interacción del virus con la membrana celular, este es capaz de invadir el citoplasma de la célula huésped en el cual algunos virus, como los virus del tipo dsRNA, pueden ser interrumpidos en su ciclo replicativo debido a proteínas como la quinasa R (PKR) o las vías del interferón. Esta ruta normalmente tiene como función la inhibición de la síntesis de proteínas, debido a la presencia de dsRNA, el cual provoca la autofosforilación de PKR, dando como resultado su forma activada, posterior a su activación PKR fosforila a la proteína eIF-2 α , lo cual provoca su afinidad de unión con eIF-2 β , esta unión bloquea la traducción en la célula evitando la replicación viral.

En células tumorales, mecanismos como los anteriormente mencionados, pueden tener defectos y esto permite la replicación viral en estas células. Algunos virus que se ven beneficiados de los defectos de la vía PKR son el virus mixoma y el reovirus vía RAS [22, 3, 23].

1.1.1 HSV-1 (T-VEC)

Este virus es basado en el virus del herpes simple, tipo I (HSV-1), T-VEC evoluciona de la cepa HSV-1 la cual causa el herpes labial, este es un virus de dsDNA, una de sus características es ser un virus altamente lítico, por otro lado es capaz de infectar células epiteliales, neuronas y células del sistema inmune, lo anterior debido a la presencia de proteínas como nectinas, glicoproteínas y HVEM en la superficie celular. T-VEC fue modificado quitando los genes de neurovirulencia (ICP 34.5) el cual le permite unirse a PKR e inactivarlo, y los genes virales que bloquean la presentación de antígenos por MHC-I de las células infectadas por el virus (ICP47). Este virus usa como mecanismo de propagación en las células tumorales la PKR y el IFN de tipo 1, la ruta anteriormente mencionada es aberrante en células tumorales por la expresión de proteínas como RAS, lo cual le permite a la célula tumoral crecer continuamente y al virus replicarse fácilmente debido a la ausencia de la acción de PKR.

La lisis ocasionada por este virus en células tumorales puede promover la respuesta de novo de las células T CD8⁺ debido a la presencia de antígenos no presentados al sistema inmune, lo anteriormente mencionado promueve la respuesta antitumoral sumado a la presencia de antígenos presentados del virus por MHC-I y a la respuesta antitumoral potenciada por la presencia de dos copias del gen GM-CSF el cual sustituye al gen ICP 34.5 [24].

1.1.2 Reovirus

El reovirus es un virus no envuelto perteneciente a la familia reoviridae, el cual infecta células de los sistemas gastrointestinal y respiratorio, cuenta con un genoma segmentado de manera dsRNA, este virus se caracteriza por ser naturalmente oncolítico debido a que se beneficia de la sobre-expresión de Ras en células tumorales, el cual al igual que en HSV-1 permite la replicación permisiva del virus debido a la inhibición de la respuesta antiviral via PKR/ eIF-2 α /eIF-2 β , por otro lado Ras puede activar diferentes proteínas corriente abajo entre las cuales se encuentran las quinasas de Raf, la PI3K y Ral, siendo esta cascada de señalización normalmente asociada con la tumorigenesis. Además de esto, ha sido comprobado que la apoptosis inducida por este virus es por la vía TRAIL/FADD/cas8 y citocromo c/SMAC/DIABLO por la vía mitocondrial [4, 25, 26, 27].

1.2 Modelo de ratón en virus oncolíticos

Los estudios llevados a cabo en modelos in-vivo con virus de tipo oncolítico como reovirus, han sido realizados primero propagando el virus en líneas permisivas para la replicación del mismo, como L929, posterior a la replicación del virus en las líneas celulares, ratones de 3 a 8 semanas de edad son usados para la implantación subcutánea de los tumores, ya sea de forma sólida o de células inoculadas. En la inoculación subcutánea de células cultivadas son usados intervalos de 5×10^5 a 2×10^6 de células tumorales diluidas en PBS en ratones tanto inmuno-competentes (C57BL/6) como inmuno-suprimidos (C3H).

En el modelo sólido son usados ratones inmunodeficientes (NOD/SCID), a los cuales les son implantados tumores sólidos de 2 x 2mm, posterior a la inoculación o inserción sólida, los ratones son inoculados con virus de manera intravenosa o intra-tumoral de 1×10^7 a 5×10^8 Pfu/ μ L de virus. Después de 10-12 días de inoculación, los ratones son sacrificados y son extraídos los tumores sólidos formados para la realización de distintas pruebas, entre las cuales se pueden encontrar inmuno-fluorescencia, FACS, Western Blot y ELISA.

En estudios llevados a cabo en otros modelos de virus como el virus poliovirus y MV (mixoma virus), se genera crecimiento tumoral a partir de la inoculación de 6×10^6 células o la inserción de tumores sólidos de

0.22 cm³. Posterior a esto, se procede a hacer una inoculación del virus de manera intraperitoneal con ocho dosis de 5×10^4 PFU para tumores sólidos o inyecciones intra-tumorales de 3×10^4 PFU del virus MV. Por otro lado, en los experimentos llevados a cabo para el poliovirus fueron usadas 6×10^6 células HTB-15 las cuales fueron inoculadas de manera subcutánea, y fueron posteriormente tratadas con 1×10^8 TCID₅₀ de poliovirus diluidos en PBS. Finalmente, los ratones son sacrificados y sus tumores son extraídos para posteriores análisis [28, 29, 30, 31].

2. CAPÍTULO ROTAVIRUS

2.1 Características generales del rotavirus

A nivel mundial este virus es una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años relacionada con la gastroenteritis infecciosa aguda, los datos reportados por la OMS en el año 2013 indican que aproximadamente 215,000 niños menores de 5 años mueren cada año debido a infecciones causadas por este virus en países en vía de desarrollo. Este virus infecta principalmente los enterocitos, teniendo como resultado la destrucción de dichas células, evitando la absorción de nutrientes y agua, lo cual tiene como consecuencia desnutrición y deshidratación, síntomas que pueden tener como desenlace la muerte [32, 33].

2.2 Morfología y Estructura

El nombre *rotavirus* (en latín *rota*: rueda) tiene como origen la morfología del mismo, debido a que su apariencia por medio de microscopía electrónica es la de una rueda de carreta antigua. Este virus pertenece a la familia reoviridae, la cual tiene como mayor característica no poseer cobertura lipídica, por otro lado contienen RNA de doble cadena (dsRNA) el cual se distribuye en 11 segmentos que codifican tanto para proteínas estructurales (VP) como proteínas no estructurales (NSP), estas proteínas se encuentran organizadas en capas concéntricas siendo así que en la capa más interna del virus se encuentren las proteínas VP2, VP1 y VP3. A continuación la segunda capa está compuesta por la proteína VP6, los virus que tienen esta recubierta son denominados DLPs (double-layered particle), los cuales tienen como característica no poder infectar las células pero al ser insertados en liposomas son activos transcripcionalmente. Por último en la capa exterior se encuentran las proteínas VP7 y VP4, los viriones que tienen estas tres capas son denominados como TLPs (triple-layered particle) y tienen como característica principal poder infectar las células que tengan proteínas específicas en su superficie (Figura 2) [34].

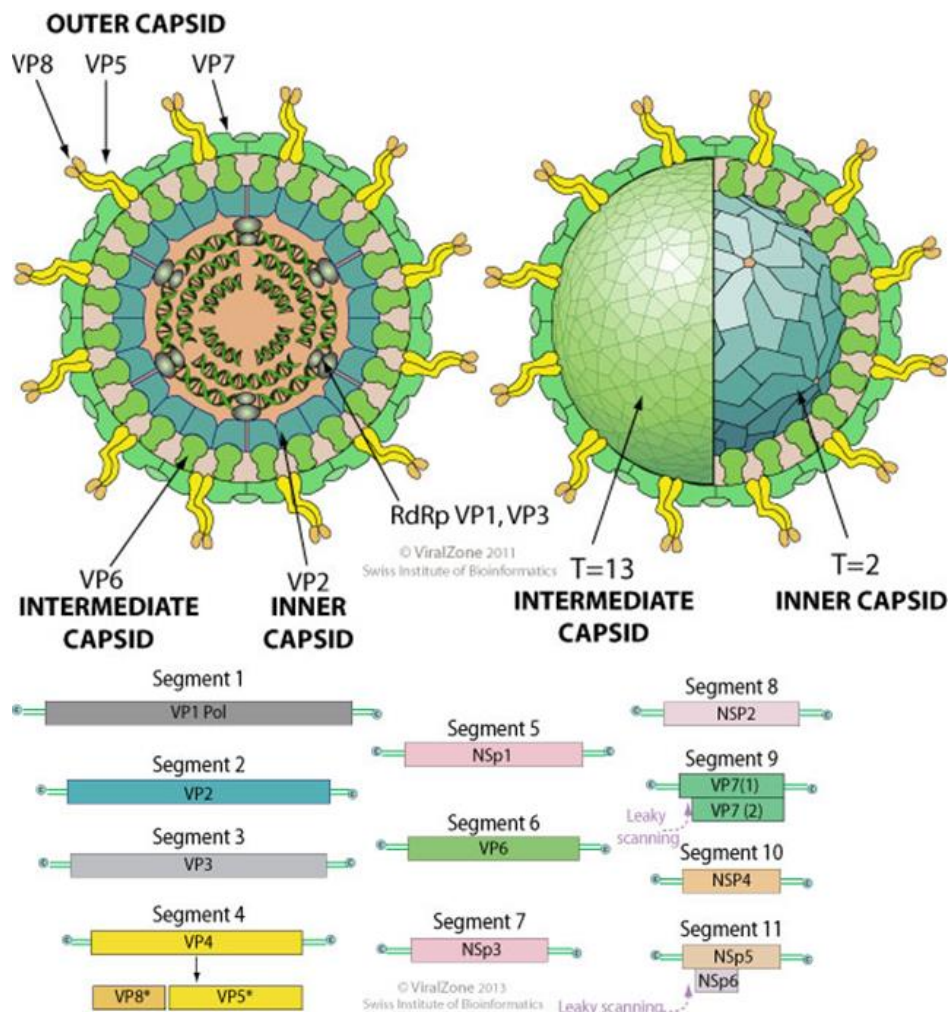


Figura 2 Estructura del rotavirus: tomado de: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/107.html

2.2.1 Características de las proteínas virales

2.2.1.1 Proteínas estructurales

Las proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) se encuentran dispuestas en tres capas concéntricas. La capa más interna del virus está compuesta por 60 dímeros de la proteína VP2, la cual envuelve el material genético interactuando por medio de residuos N-terminal junto con las proteínas VP1; que cumple la función de RNA polimerasa, y VP3 que tiene una función guanilil-transferasa y a través de su actividad enzimática permite la formación del mRNA.

La capa intermedia está compuesta por 260 trímeros de la proteína VP6, es la más abundante en la estructura del rotavirus y a su vez es la proteína más inmunogénica del mismo. Esta proteína posee un dominio inferior que consiste en un racimo de hélices- α , las cuales posibilitan la interacción predominantemente hidrofóbica entre las proteínas VP6 y VP2. En esta capa o cobertura del rotavirus existen 132 canales acuosos los cuales penetran a través de VP6 y VP7, que permiten el paso de sustratos bioquímicos hacia el interior y exterior de la cápside.

La cápside externa del virión está compuesta por las proteínas VP7 y VP4. De VP7 existen 780 copias en la parte lisa del virión que se organizan en forma de trímeros y van acompañadas de 60 espículas que están compuestas por VP4, estas se encuentran proyectadas hacia el exterior de la superficie viral. VP7 es una oligoproteína de unión a calcio, el mecanismo o papel que tiene VP7 en la infección no es muy claro hasta el momento, pero se ha determinado que la interacción con la superficie celular posterior a la unión inicial de VP4 es clave para la infección.

VP4 está compuesta por dos dominios globulares distales, uno de estos dominios se encuentra internalizado en VP7 el cual es considerado el cuerpo central de la espícula, por otro lado esta espícula de VP4 contiene un dominio distal, estos dominios son denominados VP5 y VP8 respectivamente, los cuales son producto del clivaje de la proteína VP4 por medio de la acción proteolítica de enzimas tales como la tripsina, siendo este paso de clivaje clave en el mecanismo de infección del rotavirus. VP4 tiene funciones esenciales en el ciclo viral, la más importante de ellas es la unión a proteínas de superficie celular y la penetración a la célula que infecta; así determina las propiedades, el tipo de célula huésped, virulencia, tropismo e inducción de inmunidad. [35, 36, 37, 38, 39, 40].

2.2.1.2 Proteínas no estructurales

Estas proteínas son expresadas solo cuando las células han sido infectadas por el rotavirus. Existen seis tipos de proteínas no estructurales en el genoma del virión las cuales se denominan de NSP1 a NSP6. La primera de estas (NSP1) es transcrita por el gen 5 y su función es la unión a RNA al igual que la proteína NSP2. Otra de las funciones de la proteína NSP1 es ser antagonista de la respuesta inmune innata de la célula huésped del virus, debido a que es un medio para la degradación de IRF3 siendo este un regulador del interferón en la célula [41]. NSP2 es acumulada en las inclusiones citoplasmáticas o viroplasma y es necesaria para la replicación del genoma, esta posee la capacidad de formar octámeros estables, los cuales se unen de manera inespecífica y cooperativa al ssRNA (RNA de cadena simple), por otro lado su forma octamérica le permite desestabilizar el dsRNA, lo cual le otorga actividad NTPasa [42]. NSP3 está unida al RNAm en las células infectadas y se encarga de interrumpir la traducción de las proteínas de la célula infectada, debido a que es un homólogo de la proteína celular de unión a cola de poli Adenina (PABP), NSP3 implicada en el reconocimiento del mRNA rotaviral uniéndose a este por medio de su fragmento N-terminal, priorizando la circulación del mRNA rotaviral a los ribosomas para su traducción en proteínas rotavirales por medio de la interacción de su fragmento C-terminal con la proteína eIF4G [43, 44, 45]. NSP4 cumple la función de enterotoxina, la cual ha sido reportada como virosporina y cuya función es la alteración de la homeostasis del calcio celular, provocando una alta concentración de calcio en el citoplasma de la célula infectada, lo cual facilita el ensamblaje de la proteína VP7 dentro del viroplasma. Por otro lado, esta proteína es capaz de formar un tetrámero con su fragmento C-terminal en la región citoplasmática del retículo endoplásmico, lo cual facilita el proceso de adición de VP7 y VP4 en el proceso final de ensamblaje debido a que tiene sitios de unión a VP6 y VP4 [46]. NSP5 es otra de las proteínas implicadas en el ensamblaje del virión en el viroplasma, esta proteína es una fosfoproteína dimérica rica en residuos de serina y tirosinas que sufren O-glicosilación, lo cual le permite formar complejos con las proteínas VP1 y NSP2, la función principal de esta proteína es regular la unión del RNA a NSP2 durante la replicación y empaquetamiento del virión [47]. Por último, la proteína NSP6 es una proteína de unión a ácido nucleico y es codificada por el gen 11 al igual que NSP5 en un marco abierto de lectura desfasado (Figura 2) [48, 49].

2.3 Clasificación

Este virus se encuentra clasificado en la familia viral Reoviridae, su tamaño es en promedio de 70 nm, este virus se caracteriza por ser un virus no envuelto compuesto de tres capas. Estos virus se caracterizan por tener tres especificaciones antigénicas, entre las cuales se encuentran el grupo, subgrupo y serotipo. Los rotavirus humanos (HRV) se encuentran caracterizados de la siguiente manera:

Tabla 1 clasificación serotipos rotavirales

	Grupo	Subgrupo	Serotipo
HRV	A-C	1 y 2	G 1-6,8-19 y 12 P 1, 2A, 3, 4, 5A, 8 y 11

Las categorías de serotipo G y P para las proteínas VP7 y VP4 respectivamente especifican características relacionadas con estas, siendo así que el serotipo G sea para VP7 la cual es una glicoproteína, y P sea para VP4 la cual es sensible a la acción de proteasas como la tripsina. Por medio de ensayos de neutralización con sueros hiperinmunes, se ha determinado que existen 14 serotipos G y 11 serotipos P diferentes para el rotavirus, los cuales han sido encontrados tanto en humanos como animales [50].

2.4 Epidemiología

La distribución de los serotipos del rotavirus es altamente variable de lugar a lugar, se ha identificado que en los casos de infecciones infantiles por rotavirus adjuntas a graves enfermedades, el serotipo mayormente predominante es el serotipo G1 de la proteína VP7. Por otro lado a nivel mundial se ha reportado que los serotipos predominantes de este virus son los serotipos G1-4, G9 y P1. La fragmentación del genoma del rotavirus le permite realizar recombinación cuando dos tipos de serotipos infectan la misma célula, a pesar de la existencia de esta característica de recombinación, existe predominación en los serotipos resultantes de la combinación de estos virus, los cuales se encuentran asociados con los genotipos P[8] y P[4] de la proteína VP4. Los genotipos P[8] se encuentran comúnmente asociados con los serotipos G1, G3, G4 y G9 y los serotipos G2 se encuentran comúnmente asociados con el genotipo P[4] [51, 52].

Las combinaciones de serotipos de estos virus pueden variar geográficamente y al pasar de los años, sin embargo en climas templados se ha encontrado una predominancia de los serotipos G1P[8], G3P[8], G2P[4] y G4P[8].

La vía de transmisión de este virus es fecal-oral, este virus tiene la capacidad de sobrevivir por largos periodos de tiempo debido a la formación de fómites, lo cual le permite ser altamente contagioso. En los países de clima tropical su incidencia anual es continua, sin embargo los climas fríos y secos favorecen su tendencia en la población. En Colombia se han realizado diferentes estudios sobre el rotavirus, obteniendo como resultado que alrededor del 70% de infecciones por rotavirus se presentan en niños menores de 24 meses, siendo paulatina su disminución hasta un 6.5% en niños de 48-59 meses de edad. Datos reportados por el DANE sugieren que la mortalidad por diarrea en Colombia siendo esta de 79.5/100.000 menores de 1 año y 6.9/100.000 en niños de 1-4 años de edad, siendo aproximadamente el 50% de estas muertes, causadas por rotavirus [52, 53].

2.5 Interacción virus-célula: adsorción y penetración

El proceso de interacción y entrada del rotavirus esta mediado por la capa más externa del mismo, la cual está compuesta por las proteínas VP7 y VP4, estas proteínas tienen la capacidad de interactuar con proteínas de la membrana celular. La ruptura proteolítica de VP4 en VP5 y VP8 por medio de la acción de tripsina, produce cambios conformacionales los cuales activan la partícula viral para su penetración en la membrana plasmática. Se ha comprobado que posterior a la unión, dominios de las proteínas VP7, VP4, VP5 Y VP8 interactúan con receptores celulares tales como ácido siálico, Hcs70, PDI y las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$ [54, 38, 55, 56, 57].

Estudios han sugerido que la entrada del rotavirus a la célula puede ser realizada por dos vías, la primera de estas es la penetración directa de la membrana y la segunda es la endocitosis. La disminución de concentración de iones calcio genera una desestabilización de la proteína VP7, lo cual genera una solubilización de la tercera capa del rotavirus generando la partícula denominada DLP que tiene como característica ser activa transcripcionalmente. Posterior al anclaje del rotavirus a los receptores de membrana anteriormente mencionados, la entrada del rotavirus a la célula ha sido descrita por medio de varios mecanismos de endocitosis en las diferentes cepas del virus, en algunos virus como el rotavirus UK resistente a neuroaminidasa, han sido demostrados mecanismos de endocitosis dependientes de clatrina, por otro lado se han descrito mecanismos distintos de endocitosis como es el caso del virus RRV, para el cual se ha determinado una endocitosis independiente de clatrina, caveolina, pero dependiente de dinamina 2 y colesterol. El colesterol juega un papel importante en la integridad de la membrana celular, por lo cual la depleción del mismo por medio de fármacos como M β CD, permite inhibir la entrada de RRV comprometiendo la integridad de los microdominios lipídicos. También, se ha determinado que en el mecanismo de entrada de todas las cepas de rotavirus la proteína Hsc70 juega un papel importante en la infectividad de los virus. Por último se ha sugerido que en varias de las cepas de rotavirus el mecanismo de infectividad del mismo es dependiente de la acidificación de los endosomas a excepción de la cepa RRV [58, 59].

2.6 Ciclo replicativo

La etapa inicial de la infección por rotavirus en la célula huésped involucra la unión de la partícula viral a receptores de la superficie celular, seguido por la internalización del virus en la membrana citoplasmática. La entrada a esta membrana puede ser incrementada al exponer o tratar el virus con tripsina, la cual corta la proteína VP4 en dos polipéptidos llamados VP8 y VP5. Los eventos anteriormente nombrados juegan un papel importante en el ciclo del rotavirus, el tropismo y la patogénesis del virión [60].

El rotavirus se caracteriza por tener un tropismo específico infectando las puntas de las vellosidades del intestino delgado, lo cual sugiere la presencia de proteínas de superficie existentes que son específicas para la entrada del rotavirus; como resultado, ensayos *in vitro* han demostrado un tropismo en células derivadas del epitelio renal o intestinal [61].

Estudios realizados sugieren que las proteínas VP4 y VP7 tienen la capacidad de permeabilizar membranas estando de esta manera implicadas en la entrada del rotavirus a la célula. Previo al paso de internalización en la célula se genera el cambio conformacional de las partículas virales debido a la actividad proteolítica tripsina la cual cliva la proteína VP4 en las proteínas VP5 y VP8 que facilitan la penetración de las partículas virales en la membrana citoplasmática. Se ha comprobado que posterior a la unión dominios de las proteínas

VP7, VP4, VP5 y VP8 interactúan con distintas proteínas que cumplen la función de receptores celulares, entre las cuales se encuentran el ácido siálico, Hsc70, PDI e integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$ [47, 56].

Como ha sido descrito anteriormente existen distintos mecanismos de entrada del rotavirus. Uno de los primeros pasos para el paso de TLP (partícula infectiva) a DLP (partícula activa transcripcionalmente) se da debido a las disminuciones de calcio, ya que el calcio cumple la función de estabilizar los trímeros de la proteína VP7 de la cápside exterior del rotavirus, como consecuencia se da la solubilización de la capa exterior (VP7 y VP4), y como resultado la formación de la partícula denominada DLP (double layered particle), la cual es activa transcripcionalmente, y es posteriormente trasladada al citoplasma de la célula hospedera [62].

Una vez la partícula DLP se encuentra en el citoplasma, los segmentos de dsRNA viral se unen a la polimerasa viral VP1, la cual realiza una nueva copia de este, por otro lado VP3 se acopla a este RNA transfiriendo una 7 metil guanina en el extremo 5' la cual tiene como función proteger el RNA nuevo. Este nuevo RNA sintetizado sale por medio de los canales estructurales atravesando las proteínas VP2 y VP6, comportándose como RNAm que dirigen la síntesis de las proteínas VP1, VP7 y las seis proteínas no estructurales NSP1-NSP6, y como RNA molde para la síntesis de la hebra complementaria [63, 64]

Posterior a 3-4 horas de infección debido a la acumulación de grandes cantidades de RNA y proteínas virales se forman en el citoplasma estructuras denominadas viroplasma, en las cuales se ha propuesto que se lleva a cabo el proceso de reconocimiento y distribución de cada una de las partes del genoma viral y el ensamblaje de las capas que conforman el virión. Los primeros mecanismos para la formación del virión son llevados a cabo por las proteínas VP1 y VP3, las cuales se encuentran asociadas a un segmento del RNAm, este último se encuentra asociado no solo con las proteínas anteriormente mencionadas sino también a cinco dímeros de VP2, un octámero de NSP2 y un dímero de NSP5, el conjunto proteico anteriormente mencionado forma la capa intermedia de replicación. Esta capa intermedia de replicación es ensamblada por medio de la polimerización de 12 de estos complejos proteicos. Adjunto a la formación de esta capa el (+) RNA sintetizado sirve como hebra molde para la formación del (-) RNA, lo cual permite la generación del dsRNA, todo esto es llevado a cabo simultáneamente con el empaquetamiento de los 11 segmentos del genoma y la adherencia de la proteína VP6, lo cual permite la formación de la doble capa [63].

Para el ensamblaje de la proteína VP7 la cual forma trímeros de la misma en la capa exterior del virión son necesarias altas concentraciones de calcio, las cuales no se encuentran disponibles en el citoplasma, para esto el rotavirus usa la alta concentración de calcio disponible en el retículo endoplásmico que lo hace por medio de la penetración del virión maduro en el retículo mediante la interacción de VP6 con NSP4, siendo en esta unión donde se unen posteriormente las proteínas VP4 y VP7 [65, 66]. La proteína viral NSP4 juega un papel importante en el ensamblaje de la capa exterior del virión, la parte N terminal de esta proteína se extiende al lumen del retículo endoplásmico, causando que cuando esta pase del retículo al citosol se tetramerice [67, 68]. Se ha reportado que el fragmento c terminal de la proteína NSP4 se une tanto a DLPs como a VP4 [69, 70, 71], algunos resultados sugieren que la proteína VP7 interactúa con el fragmento N terminal de la proteína NSP4 [72], permitiendo de esta manera un reclutamiento de VP4/DLP/NSP4 en la parte citosólica de la membrana del retículo endoplásmico, lo cual genera una deformación del retículo, Posterior a esto, la pérdida de la membrana permite el ensamblaje de VP7 sobre la partícula [73].

Uno de los mecanismos implicados en la replicación viral, es llevado a cabo por las proteínas NSP1 y NSP3, esta última dirige la maquinaria celular a la síntesis exclusiva de las proteínas virales, reduciendo la síntesis de las proteínas celulares. Como resultado del desplazamiento de la proteína PABP (Poly A binding protein), realizado por NSP3 en el complejo de traducción ribosomal, se prioriza la traducción de mRNAs que posean la secuencia consenso GACC 3', la cual esta conservada en los once fragmentos de RNA viral. Por otro lado, la proteína NSP1 tiene como función ser antagonista del interferón, permitiendo que no exista respuesta inmune mediada por el interferón en la infección por rotavirus en la célula huésped [64, 74, 45, 75].

Por último, la liberación de los virus completos al exterior de la célula ha sido reportada por distintos mecanismos los cuales van desde la lisis en células renales, tráfico y secreción a través de la superficie apical a uso del aparato de Golgi y lisosomas (Figura 2) [76, 77].

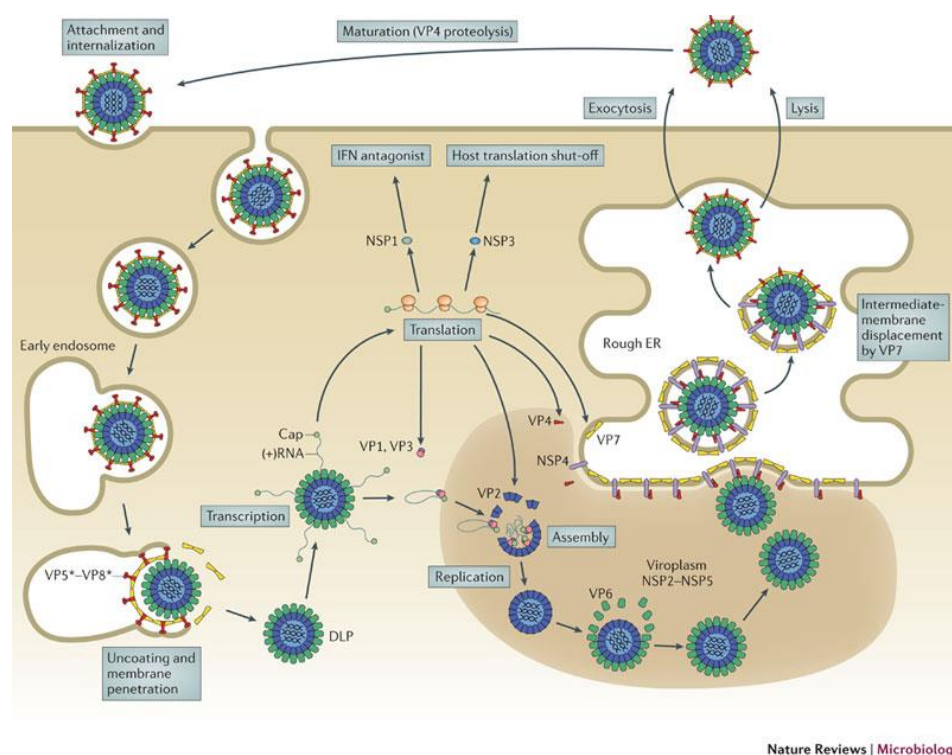


Figura 3 ciclo de replicación del rotavirus. Tomado de: *Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication* [69]

2.7 Riesgos de laboratorio

El rotavirus es clasificado en un nivel de bioseguridad 2, para este tipo de nivel de bioseguridad son requeridos los siguientes procedimientos:

1. El personal de laboratorio debe tener el entrenamiento específico en el manejo de agentes patogénicos y debe ser supervisado por científicos competentes en el manejo de agentes infecciosos.
2. El acceso al laboratorio debe ser restringido cuando sea usado el agente patológico
3. Todos los procedimientos llevados a cabo en los cuales se generen aerosoles infecciosos deben ser realizados en cabina de bioseguridad.

4. Las personas que manejen los materiales, deben lavar sus manos, posterior a la ejecución de cualquier experimento o manipulación del agente patológico.
5. Comer, beber, fumar, llevar lentes de contacto, aplicar cosméticos o guardar alimentos para el consumo humano deben ser restringidos en el área del laboratorio. Cualquier alimento para consumo humano debe ser guardado en un lugar fuera del laboratorio.
6. El pipeteo con la boca es prohibido, cualquier pipeteo debe ser realizado por medio de pipetas mecánicas.
7. El uso de materiales tales como: bisturíes, escalpelos, agujas y pipetas debe ser llevado a cabo con cuidado evitando el contacto de estas con la piel humana, las agujas y hojas de bisturí, deben ser dispuestas en contenedores posterior a su uso, en caso de que alguno de estos materiales no sea desechable debe ser descontaminado para su posterior uso por medio de autoclave.
8. Se debe evitar la creación de aerosoles en los procedimientos
9. El área de trabajo debe ser descontaminada posterior a la realización de los procedimientos

Los anteriores procedimientos deben ser llevados a cabo para el mantenimiento de la bioseguridad en las áreas de trabajo [78, 79].

2.8 Receptores celulares de rotavirus

En la literatura han sido reportados distintos receptores proteicos, los cuales permiten la entrada del rotavirus en la célula huésped y a su vez ha sido reportada su sobre expresión en células tumorales algunos de estos son.

2.8.1. Generalidades de la PDI

La proteína disulfuro isomerasa (PDI) tiene un peso aproximado de 56 kDa, su secuencia es de 490 aminoácidos, esta proteína pertenece a la familia de las enzimas tiol-reductasas, las cuales tienen como función intervenir en el correcto plegamiento, formación y remodelación de los puentes disulfuro de las proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso. Estas proteínas presentan dos dominios externos denominados a y a', estos dominios poseen actividad catalítica, oxidoreductasa y disulfuro isomerasa; por otro lado, poseen dos dominios internos denominados b y b', los cuales les confieren interacciones no-covalente con los sustratos. Estas proteínas son sobre expresadas bajo condiciones de estrés [80].

2.8.1.1 Estructura de la PDI

Esta proteína se encuentra organizada en 5 diferentes dominios (a,b,b',a' y c). los dominio a y a' son homólogos a la tioredoxina, cada uno de estos dominios posee dos cisteínas en la secuencia WCGHCK, las cuales median la actividad catalítica de PDI. Los dominios inactivos b y b' poseen secuencias similares entre sí, pero no con la tioredoxina. Los dominios a y b de esta enzima adoptan plegamientos como la tioredoxina, a pesar de que en el dominio b no exista una secuencia similar a esta. Todos los dominios de esta proteína se caracterizan por tener una carga negativa, pero los dominios b y c son particularmente acidicos. Esta proteína es altamente abundante en el retículo endoplásmico de las células debido a su ambiente redox lo cual facilita su actividad catalítica [81].

2.8.1.2 PDI y cáncer

Diferentes estudios en células cancerígenas han asociado la sobreexpresión de PDI con la progresión y agresividad de diferentes tipos de cáncer, entre los cuales se encuentran: cerebro, linfoma, riñón, ovario, próstata y pulmón, estos estudios han usado el método de micro arreglos, por medio de los cuales se ha identificado una sobreexpresión de esta proteína mayor al doble comparada con los tejidos normales de estos

tipos de cáncer. Por otro lado, también se ha visto asociada la sobreexpresión de este tipo de cáncer con los procesos de metástasis e invasión, un ejemplo de lo anteriormente mencionado es la sobre expresión de PDI en la metástasis de nódulo linfático axilar procedente de seno, la cual, a comparación del tumor primario de seno presenta una mayor expresión de PDI. Esta proteína es un sustrato de las caspasas 3 y 7, por lo que se ha relacionado la sobreexpresión de la misma con la supervivencia de células AML HL-60 tratadas con etopósido [82]. Debido a la alta demanda de síntesis de proteínas funcionales en las células cancerígenas, se postula que PDI es un punto clave en el mantenimiento de los mecanismos transcripcionales y traduccionales en células cancerígenas, favoreciendo de esta manera la proliferación y migración de estas células tumorales [83].

2.8.1.3 PDI y rotavirus

Estudios realizados en el grupo de investigación de biología molecular de virus en la Universidad Nacional de Colombia en el año 2011 determinaron que la proteína anteriormente nombrada posee una interacción directa con las proteínas virales ya sea en forma de DLP o TLP, lo cual sugirió que en la línea celular MA104 y en las células intestinales aisladas de ratón ICR, la proteína PDI jugaba un papel en la infección del rotavirus, y en la interacción del rotavirus con las células, específicamente en los eventos tempranos de la entrada del rotavirus. Esto sugiere que las proteínas estructurales del rotavirus tales como VP4, VP6 y VP7 son sustratos de la proteína PDI en su actividad reductora, dado que las proteínas virales anteriormente mencionadas poseen grupos tiol los cuales pueden ser modificados por la proteína PDI en la entrada del rotavirus a las células [84].

2.8.2.1 Generalidades de las Integrinas

Las integrinas son una familia de heterodímeros α y β de los receptores de adición celular, su función es mediar la interacción de la célula con la matriz extra celular y la interacción célula-célula, por otro lado también tiene funciones tales como receptores de señalización, los cuales median en diferentes procesos celulares tales como la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia [85, 86].

2.8.2.2 Estructura de las integrinas

En vertebrados existen 18 sub unidades α y 8 β las cuales tienen distribuciones distintas. Las subunidades α y β están constituidas por dominios con uniones flexibles entre ellas, cada una de las subunidades se caracteriza por tener una hélice que abarca la membrana y una cola en el citosol. La cadena α de estas proteínas contiene cuatro o cinco dominios extracelulares, los cuales interactúan con una hélice β seguidos de una curvatura unida a dos dominios Calf (calcium channel localization factor). Por otro lado la cola β tiene siete dominios que tienen diferentes interconexiones entre sí, uno de los dominios β -I se encuentra insertado en un dominio híbrido compuesto, el cual se encuentra girado en un dominio PSI (plexin-semaphorin-integrin), estos dominios están seguidos de cuatro módulos de factor de crecimiento epidérmico (EGF) ricos en cisteína y una cola β . La actividad de estas proteínas es dependiente de la presencia de iones divalentes de calcio, magnesio y manganeso, los cuales median los cambios estructurales para la activación de estas proteínas [87].

2.8.2.3 Integrina α V β 3 y cáncer

Las integrinas son moléculas que en la actualidad son un objetivo para el tratamiento contra cáncer debido a la interacción con la matriz extra celular y su relación con la tracción y la motilidad que puede facilitar la invasión y migración de células cancerígenas; dado que estas proteínas son capaces de regular a su vez la

proliferación celular, han sido de alto interés en estudios relacionados con cáncer y metástasis [88]. Muchos de los tumores sólidos provenientes de células epiteliales expresan integrinas tales como $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 3\beta 1$, las cuales son retenidas en el tumor. Estas integrinas a su vez median la adición de estos tumores a las membranas, algunas de estas integrinas anteriormente descritas se han visto relacionadas con la diseminación tumoral tal como la integrina $\alpha 2\beta 1$ debido al decrecimiento de su expresión en algunas líneas tumorales [89]. Estas proteínas tienen la capacidad de promover señales intracelulares debido a su presencia en las bicapas lipídicas, la interacción de estas con el medio extracelular puede mediar la supervivencia celular o la apoptosis, de tal forma que las integrinas ligadas median la supervivencia por medio de la expresión de proteínas tales como BCL2, la cascada de señalización PI3K-Akt, Nf κ B o la inactivación de p53. Estas señales de supervivencia se encuentran relacionadas por pares integrina- receptor de factor de crecimiento, algunos de estos receptores tales como el receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGFR) al solaparse con la integrina $\alpha v\beta 3$ evitan la apoptosis por vía intrínseca en células endoteliales [90].

2.8.2.4 integrinas y rotavirus

Se ha demostrado que el rotavirus tiene un tropismo específico por células intestinales, pero a su vez estos virus tienen la capacidad de infectar células provenientes de origen del epitelio renal o intestinal, lo cual sugiere moléculas o receptores comunes entre las células anteriormente mencionadas, pues facilita la interacción y entrada del rotavirus a dichas células. Es común que algunas líneas de rotavirus de origen animal tengan como blanco proteínas ricas en el ácido siálico, las cuales están presentes en la superficie celular, sin embargo, se ha observado que algunas líneas del rotavirus no son dependientes de la presencia de esta molécula para entrar e infectar las células, siendo así que exista otro grupo de receptores posibles para la interacción y entrada del rotavirus en las células [91, 92, 93].

Las integrinas son comúnmente usadas por algunos virus en su entrada, entre ellos el rotavirus, Se ha observado una interacción directa entre la capa exterior de este virus y diferentes integrinas en los estados tempranos de infección, siendo así que se observan interacciones directas entre la proteína VP4 y $\alpha 2\beta 1$ [94]. Por otro lado estudios realizados en el año 2000 lograron determinar que las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$ juegan un papel importante en la infección de los rotavirus RRV (dependiente de ácido siálico) y nar3 (independiente de ácido siálico) en la línea células MA-104, en ambos virus la interacción con estas integrinas sucede posterior a la unión del rotavirus a la superficie celular, sugiriendo de esta manera un papel importante en la entrada del rotavirus por estas proteínas [95]. Posterior a esto otros estudios lograron determinar la interacción de VP5 subunidad de la proteína VP4 con las integrinas $\alpha 2\beta 1$ debido a la presencia de la secuencia DGE entre los aminoácidos 308-310 de la proteína VP5 los cuales son una secuencia ligando homólogo derivado del colágeno de tipo I, a su vez este estudio logró determinar la interacción de la proteína VP7 con las integrinas $\alpha X\beta 2$ y $\alpha v\beta 3$, debido a la presencia de la secuencia ligando GPR entre los aminoácidos 253-255, la cual es homóloga al fibrinogeno , aclarando de esta manera que las integrinas que interactúan con las proteínas rotavirales [96, 97, 98].

2.8.3.1 Generalidades de las Chaperonas HSPS

Estas proteínas pertenecen al grupo de las chaperonas, siendo su función la asistencia en el plegamiento de las proteínas posterior a su síntesis. Otras de las funciones de este grupo es la asistencia de plegamiento en la formación de agregados proteicos que pueden propiciar interacciones inespecíficas. Este grupo de proteínas son activadas a su vez como respuesta ante el estrés oxidativo en las células y son clasificadas en familias teniendo en cuenta su tamaño o función en el siguiente orden: HSP100, HSP90, HSP70, HSP40, HSPB y chaperoninas.

La activación de los genes relacionados con la HSP, son coordinados por medio de diferentes eventos bioquímicos y genéticos adjuntos a la HSR (Heat Shock Respond), la activación de esta última es una respuesta de protección celular que es activada en células las cuales están expuestas a daño molecular, sin embargo la sobre expresión o la expresión aberrante de esta familia de chaperonas se ha visto relacionada con distintas enfermedades, entre las cuales se pueden encontrar desordenes neurodegenerativos y cáncer.

Las chaperonas son definidas como cualquier proteína capaz de interactuar y/o intervenir en la estabilización de otra proteína, permitiendo así un cambio conformacional en el cual ésta es activa sin que la proteína chaperona esté presente en la estructura final. Estas proteínas son relacionadas comúnmente como proteínas de estrés o proteínas de choque térmico, debido a que su incremento es directamente proporcional al aumento de estas dos condiciones en las células, de este modo estas proteínas tienen varias funciones en estas condiciones tales como: mantenimiento del proteoma, plegamiento de novo o replegamiento de proteínas desnaturalizadas debido a condiciones de estrés, ensamblaje oligomérico, tráfico de proteínas y asistencia en la degradación proteolítica. Algunas de las proteínas de esta familia con mayor actividad durante el plegamiento de novo son las proteínas HSP70, HSP90 y las chaperoninas HSP60s, estas promueven el plegamiento de otras proteínas siendo dependientes del aporte energético de la molécula ATP, su mayor actividad se encuentra en secuencias de aminoácidos hidrófobas [99].

Una de las chaperonas de este grupo es la chaperona HSP70 esta puede ser expresada de manera inducida pero a su vez existe de manera constitutiva en todas las células, este grupo de proteínas tiene una función importante en el plegamiento de proteínas y el control de la proteostasis, por otro lado el aumento de la presencia de este grupo de proteínas ha demostrado eficacia en la agregación de proteínas tóxicas [100, 101].

Esta proteína tiene como mayor característica poseer un dominio N-terminal ATPasa, este fragmento es altamente conservado en este grupo de proteínas, por otro lado, estas proteínas poseen un fragmento C-terminal altamente variable, el cual es el fragmento de unión al péptido, estos fragmentos se encuentran unidos por una región sensible a proteasas [102, 103, 104]. Las proteínas HSP 70 a su vez tiene una función ATPasa, esta función es usada para el desmontaje de vesículas recubiertas de clatrina, mecanismo que es usado en el transporte de componentes a través de la membrana celular [105, 104].

2.8.3.2 HSPs y cáncer

Una de las chaperonas identificadas en cepas tumorales es la HSP90 este grupo de chaperonas controlan distintas funciones en importantes vías de señalización, entre las cuales se pueden encontrar la progresión del ciclo celular, el mantenimiento de los telómeros, apoptosis, la inmunidad innata y la degradación de proteínas, siendo así que este grupo de proteínas sean importantes para la amortiguación de efectos desestabilizantes o inductores de las mutaciones en complejos proteicos [106]. Este grupo completo de moléculas denominadas chaperonas han sido observadas como altamente activas en células tumorales debido al factor de choque térmico 1 (HSF1), siendo así que la activación de HSF1 y la acumulación de HSPs participen en el fenotipo maligno de las células tumorales, participando con su función reparadora en condiciones de estrés tales como el tratamiento tumoral [107, 108].

2.8.3.3 Hsc 70

En el año 2002 se identificó que la forma constitutiva Hsc70 juega un papel importante en la entrada de rotavirus en las células MA104 y en las células intestinales en ratones lactantes de la cepa ICR [109, 110].

En el grupo de investigación de biología molecular de virus de la Universidad Nacional de Colombia, ha sido reportada la participación de la proteína Hsc70 en la entrada del rotavirus. El bloqueo de esta proteína realizado por medio de la adición de anticuerpos monoclonales específicos anti-Hsc70 y sueros hiperinmunes de conejo (generados con proteínas recombinantes purificadas), logran bloquear la entrada del rotavirus al ser pre incubados con las células previo a la infección.

Por otro lado, se observó que al incubar las células con los anticuerpos posterior a la infección, no tenía el mismo efecto, por lo tanto los resultados sugerían una interacción inicial de la proteína Hsc70 con el rotavirus, esta hipótesis fue comprobada por medio de la pre incubación de TLPs y DLPs del rotavirus con proteínas recombinantes Hsc70, para luego realizar un ensayo de infección con este tratamiento. Se obtuvo como resultado un bloqueo de la infección en las TLPs pre incubadas con Hsc70, mas no en las DLPs, lo cual sugirió una interacción directa de una de las proteínas que componen el TLP con la proteína Hsc70 [110].

En el año 2003 fue demostrado que la subunidad VP5 de la proteína VP4 del rotavirus interactúa con la proteína Hsc70, este estudio fue realizado a partir del péptido KID de la proteína VP5 el cual contenía el dominio comprendido entre los aminoácidos 642-659 de la proteína, siendo así que por medio de un ensayo de competencia junto con el virus RRv y el virus nar3, se lograra determinar una interacción de este péptido con la proteína Hsc70. Por otro lado este estudio logro concluir que la interacción de esta proteína recombinante (KID) con Hsc70 inhibe la infectividad de los virus RRv y nar 3 en células MA104 mas no su unión a la superficie de las células, lo cual sugirió que la interacción VP5-Hsc70 se da posterior a la unión del virus a la superficie celular [111].

2.8.4 Otros receptores candidatos

En el laboratorio de biología molecular de virus de la Universidad Nacional de Colombia, se está estudiando la participación de las proteínas de choque térmico Hsp90, Hsp70, Hsp60 y Hsp40, como posibles moléculas participantes en el proceso de entrada de los virus oncolíticos a las células tumorales. Dicho estudio, aun no se ha concluido.

3. ANTECEDENTES

El director del presente proyecto, Carlos A Guerrero F, coordinador del laboratorio de Biología Molecular de virus de la Universidad Nacional de Colombia realizó la adaptación de diferentes serotipos del rotavirus (TRF-41,RRV,UK (G5-P5),Ym (G11-P9), Ecwt, Wa (G1-P8),Wi61 (G9) y M69 (G8)) a líneas tumorales, entre las cuales se encuentran Caco-2, Kato III, MCF-7, PC-3, U937, A549, SP2/O-ag14 y REH. El investigador, después de realizar 150 pasajes de cada una de las diferentes cepas de rotavirus, realizó combinaciones de virus en las distintas líneas celulares, obteniendo aislados rotavirales nuevos y diferentes a los parentales que fueron nombrados como: TRUYO(TRF, RRV, UK, Ym, OSU), WWM (Wa, Wi, M69) y WT1-5 (aislados rotavirales de 5 pacientes). Cada una de estas combinaciones rotavirales fue pasada 100 veces por cada una de las líneas celulares, posterior a todos los pasajes de los aislados rotavirales estos fueron combinados con el virus Ecwt, generando la combinación rotaviral WTEW, la cual fue pasada 100 veces por las distintas líneas celulares [112]

A los distintos aislados rotavirales anteriormente mencionados, les fueron practicados pruebas de infección y replicación viral mediante inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, citometría de flujo, western blot, re-infecciones, ELISA de captura, y señales de muerte. Estas sugirieron una adaptación de los distintos aislados rotavirales a las líneas celulares, debido a la capacidad de infectar las células tumorales y replicar su material genético de mejor forma respecto a las cepas parentales de las cuales procedían. Igualmente, se pudo evidenciar la fragmentación del material genético de las celulares tumorales, acompañadas de distintas señales de muerte, tales como anexina V, yoduro de propidio, PPAR y 7-AAD, que sugirió en su totalidad que existía una adaptación de los aislados rotavirales en las distintas líneas tumorales y una muerte inducida por la infección rotaviral en las mismas.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se considera que los rotavirus utilizan como receptor funcional un complejo de varias macromoléculas, que incluyen las integrinas $\alpha\beta3$, $\alpha2\beta1$, $\alpha\beta2$, la proteína de choque térmico Hsc70 y la PDI [109, 110, 56, 113]. Se sabe que el rotavirus presenta la capacidad de infectar líneas celulares de cáncer colorectal como Caco 2 y células HT-29 [114, 115]. En el Laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, se han realizado estudios en los cuales se encontró que las cepas rotavirales seleccionadas por el director del proyecto, infectan y lisan las líneas celulares Sp40 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) y PC3 (adenocarcinoma grado IV de próstata), sugiriendo que las cepas estudiadas son potenciales virus oncolíticos.

Sin embargo, se requiere extrapolar los resultados llevados a cabo en estudios *in vitro* a un modelo *in vivo*, en las líneas tumorales antes señaladas, a un modelo *in vivo*, en el modelo Balb/c, debido a que es preciso observar si el comportamiento oncolítico del virus WTEW se conserva bajo las variables de un modelo *in vivo*, en las cuales están presentes no solo la distribución espacial de las células tumorales, si no a su vez el sistema inmune del modelo Balb/c. Por esta razón es necesario determinar la capacidad oncolítica del rotavirus WTEW en tumores generados a partir de células SP2/O en ratones Balb/c, en los denominados

tumores alogénicos. Para esto, se determinó la infección del rotavirus WTEW en los tumores generados en ratones Balb/c con la línea celular SP2/O, se analizaron las señales de muerte celular en las células infectadas con rotavirus mediante técnicas inmunológicas en células aisladas del tumor y en cortes histológicos. Igualmente, se determinó la presencia de anticuerpos anti-rotavirus en el suero del ratón al cual se le generó el tumor y fue inoculado intratumoralmente con el rotavirus WTEW.

5. JUSTIFICACION

En la actualidad se buscan nuevas alternativas para la prevención y opciones terapéuticas al tratamiento convencional del cáncer (radioterapia y quimioterapia). Se ha reportado que algunos virus pueden infectar, disminuir la viabilidad de células tumorales o lisarlas (oncólisis). Estos virus se estudian primero *in vitro* en líneas tumorales, luego *in vivo* en modelos animales y posteriormente en los pacientes humanos. En la actualidad unos pocos virus se estudian en fase clínica en pacientes. Hasta la fecha no existe ningún reporte donde se evalué el rotavirus como potencial virus oncolítico. Nuestro laboratorio ha reportado que $\alpha V\beta 3$, PDI y Hsc70 están asociadas tanto *in vivo* como *in vitro* al proceso de infección por rotavirus. Teniendo en cuenta que PDI y Hsc70 no se expresan en la membrana de células del tejido normal y si en la membrana de células neoplásicas, el laboratorio ha postulado que el rotavirus puede utilizarse como virus oncolítico en los tumores donde estas proteínas de membrana se expresen. El objetivo del presente trabajo es evaluar el potencial del rotavirus WTEW como virus oncolítico en un modelo celular *in vivo* de mieloma murino. Para desarrollarlo nos propusimos: 1. Determinar la susceptibilidad a la infección del tumor alogénico generado con la línea celular Sp2/0-Ag14 al inocularlo intratumoralmente con rotavirus WTEW y 2. Describir el efecto citopático de la infección rotaviral en el tumor alogénico. Para desarrollar estos objetivos se desarrollará un tumor alogénico en los ratones Balb/c con la línea Sp2/0-Ag14, luego el ratón fue inoculado intratumoralmente con rotavirus y se evaluó la infección rotaviral mediante inmunocitoquímica e inmunofluorescencia. Se determinaron los efectos citotóxicos mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen moléculas pro-apoptóticas mediante epifluorescencia.

La anterior metodología fue llevada a cabo, porque algunos ensayos clínicos han demostrado que los virus oncolíticos se pueden administrar sistémicamente de forma segura y con una baja toxicidad. La administración intravenosa ofrece la oportunidad de tratar el tumor primario y la metastásis simultáneamente. No obstante, algunos estudios muestran que la eficiencia podría estar limitada por la toxicidad sobre los tejidos normales y/o la presencia de una respuesta inmune preexistente en los sujetos tratados. Por esta razón fue necesario realizar el estudio *in vivo*, en un tumor alogénico porque nos permitirá predecir en forma indirecta si el rotavirus WTEW al aplicarlo intratumoralmente es seguro; es decir, evaluar que no se expanda o infecte otros órganos, si se replica y si mata eficientemente las células tumorales Sp2/0-Ag14 como se ha visto con esta línea tumoral *in vitro*. En los ensayos *in vitro* el WTEW tiene la capacidad de generar distintas señales de muerte entre las cuales se encuentran rompimiento del material genético celular, y la permeabilización de membrana evidenciada por la presencia de células anexina V positivas, yoduro de propidio positivas y otros marcadores de muerte.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad oncolítica de rotavirus WTEW en tumores alogénicos, generados a partir de células Sp2/0-Ag14, en ratones Balb/c.

6.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la infección en tumores generados en ratones Balb/c con la línea celular Sp2/0-Ag14, luego de ser infectado intratumoralmente con rotavirus WTEW.
2. Determinar señales de muerte celular luego de infectar intratumoralmente con rotavirus WTEW las células del tumor.
3. Determinar la presencia de anticuerpos anti-rotavirus en el suero del ratón al cual se le generó el tumor y fue inoculado intratumoralmente con el rotavirus WTEW.

7. HIPOTESIS

El rotavirus WTEW seleccionado en el laboratorio de Biología Molecular de Virus como virus oncolítico infecta y lisa las células la SP2O/ag-14 *in vitro*. Al aplicar el rotavirus WTEW en tumores alogénicos generados a partir de células SP2O/ --- estos infectan, se replican e inducen señales de muerte celular al aplicarlo directamente en el tumor, *in vivo*.

8. METODOLOGIA

8.1Diseño experimental

8.1.1Animales virus y reactivos

Se adquirieron ratones de la cepa Balb/c del biotério del Instituto Nacional de Salud (INS) de 19 días, de edad y se dejaron adaptar al laboratorio durante 3 semanas (total 6 semanas de edad); al momento de su utilización tenían un peso promedio entre los 25 y 30 gramos. El rotavirus WTEW fue generado en el laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Universidad Nacional de Colombia por el profesor Carlos Arturo Guerrero Fonseca, este virus fue replicado en diferentes líneas tumorales para generar especificidad anticancerígena y fue purificado finalmente por ultracentrifugación en cloruro de cesio (CsCl). El rotavirus WTEW utilizado en el presente trabajo fue suministrado por el profesor Carlos Arturo Guerrero Fonseca.

En el presente estudio se utilizaron los siguientes anticuerpos: sueros hiperinmune anti-Rotavirus generados en ratón, conejo, cabra y cobayo, sueros hiperinmunes anti-NSP4, anti-NSP5, anti-NSP2, anti-NSP6, anti-PDI y anti-Hsp90 generados en ratón, conejo y cobayo en el Laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Universidad Nacional de Colombia, utilizando como antígeno proteínas recombinantes de RRV. Los anticuerpos fueron generados con anterioridad al presente trabajo.

Anticuerpos comerciales primarios: anti-PARP clivado (sc-56196), anti-Cas3 (sc-65496), anti-citocromo C (sc-13561), anti-BAX (sc-20067) generados en ratón todos de Santa Cruz Biotechnology Dallas Texas United States.

Anti-NfκB (PA1-14295 Thermo Scientific Rockford USA) generado en conejo, anti-BID (sc-11423) anti-Cas9 (sc-8355) anti-Smac(sc-22766) generados en conejo, anti-COX2 (sc-19999) generado en ratón, anti-COX4 (sc-69359), anti-Cas7 (sc-8510) generados en cabra todos de Santa Cruz Biotechnology Dallas Texas United States.

Anticuerpos secundarios: cabra anti-conejo IgG-HRP (sc-2030), cobayo anti-cabra IgG-HRP (sc-2020), cabra anti-ratón IgG-HRP (sc-2031), cabra anti-ratón IgG₁- FITC (sc-2078), ratón anti-cabra IgG-HRP (sc-2354), cobayo anti-conejo IgG-FITC (sc-2090) todo de Santa Cruz Biotechnology Dallas Texas United States.

8.1.2 Condiciones ambientales en las que se mantuvo a los ratones

El tratamiento y mantenimiento de los ratones se realizó teniendo en cuenta la Ley 84 de 1989 (Estatuto Nacional de Protección de Animales). Los ratones fueron mantenidos durante un tiempo máximo de 2 meses en un biotério con dimensiones de 36.5cm de alto, 39 cm de ancho y 31 cm de largo, construido con vidrio acústico evitando el estrés causado por el ruido. Los ratones fueron puestos en parejas en jaula de metal con una malla de ventilación superior de 25cm de largo, 12.5cm de alto y 18 cm de ancho, cada jaula poseía una zona de alimentación aislada y se les administró un biberón de agua de la llave previamente autoclavada y como alimento concentrado para roedores (Agrinal[®]). La temperatura se mantuvo entre 20 a 22 °C generada por un bombillo de 40V. El biotério fue ubicado en el Laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia. El presente estudio fue avalado por el consejo de facultad por medio del acta No. 19 del día 08 de junio de 2017.

8.1.3 Obtención del título viral

Previamente se había determinado que los aislados rotavirales con actividad oncolítica, obtenidos en el laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Universidad Nacional de Colombia, incluido WTEW, tienen capacidad infecciosa y lítica en la línea Sp2/0-Ag14 de manera similar [116]. Al momento del experimento contábamos con tres virus purificados con CsCl₂ (WTEW, WTE1-5 y ECwt) y se quiso determinar cual estaba en mayor concentración. Para esto, 300.000 células Sp2/0-Ag14 en 300 µl medio de cultivo en placas de 24 pozos se aplicó diferentes diluciones de cada uno de los tres rotavirus, así: del stock que se tenía se hizo una dilución 1:100 y a partir de esta dilución se hicieron nuevas diluciones (1:30, 1:15 y 1:7.5) de cada uno de los virus anteriormente mencionados (dilución total 1:3000; 1:1500 y 1:750). Las células se cultivaron en incubadora a 37°C, con CO₂ al 5% durante 12 h. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% 30 min a 4°C y la infección fue analizada mediante inmunofluorescencia usando sueros hiperinmunes anti-rotavirus con una dilución 1:3000, en un microscopio VanGuard.

Por último, se calcularon los títulos virales por medio de la ecuación [título=volumen x conteo células positivas x dilución x número de fotos].

8.1.4 Proceso de inmunosupresión, inoculación celular e infección de los ratones y aislamiento de tumor.

Con el propósito de generar los tumores en los ratones Balb/c, ya adaptados a las condiciones del laboratorio, de 6 semanas de edad (n=8) se inmuno-suprimieron localmente por medio de la inoculación de 100 µL de 2,6,10,14-Tetramethylpentadecane (Pristan[®]) subdermico en el área abdominal; 5 días posterior a la inmunosupresión fueron inoculados con 1x10⁶ células Sp2/0-Ag14 en 100 µL de medio de cultivo RPMI sin suero fetal bovino, de manera subdérmica en la misma área. Los ratones fueron monitoreados para

evaluar el crecimiento tumoral diariamente y se realizó registro del peso total por medio de una balanza y el área tumoral de cada ratón por medio de un calibrador (vernier de acero marca Wolfox) **tomando las medidas de ancho y alto usando la fórmula $V=ab^2/2$ donde a es el diámetro mas largo y b es el diámetro más corto [117]**, que da como resultado el volumen aproximado exterior del tumor. cabe aclarar que existen otras fórmulas para medir los volúmenes tumorales tales como $V=A^2 \times L \times 0.5235$ (elipsoide), teniendo en cuenta que la forma del tumor es similar a la de una esfera. Cuando el volumen del tumor llegó aproximadamente a 0.12 cm^3 (aproximadamente, 5 días post-inoculación) se inocularon de manera intratumoral $100 \mu\text{L}$ de medio RPMI los cuales contenían de 3.300 partículas virales del rotavirus WTEW cada 3 días para un total de 3 dosis o PBS en el ratón control.

Posterior a esto, se practicó eutanasia a los ratones por dislocación cervical 15 días posteriores a la primera inoculación viral debido al tamaño tumoral evidenciado en los ratones control. Posterior a esto, se extrajo el tumor, del cual fue extraído 1 g y fijado con paraformaldehído al 10% para realizar cortes histológicos. El tumor restante fue macerado en medio RPMI y posteriormente fijado con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a 4°C . Luego, las células extraídas del tumor fueron centrifugadas a 1200g para separar el sobrenadante de paraformaldehído y fueron re-suspendidas en PBS.

Paralelamente a la dislocación cervical, los ratones fueron desangrados por decapitación. Los coágulos formados fueron macerados y homogeneizados con PBS, se centrifugó a $3500 \times g$ durante 30 min, se recuperó el sobrenadante con azida de sodio y se guardó a 4°C .

8.1.5 Inmunocitoquímica de Tumores Aislados

Para determinar la presencia de antígenos rotavirales los tumores aislados del modelo de tumor alogénico Balb/c SP2/O-Ag14 se maceraron con un mortero y una malla en medio de cultivo RPMI y las células individualizadas fueron fijadas posteriormente con paraformaldehído al 4%, luego fueron centrifugadas a 1200 rpm y lavadas con PBS. A continuación, a $20 \mu\text{L}$ de células ($\approx 4.8 \times 10^6$) aisladas de cada uno de los tumores les fueron adicionados $20 \mu\text{L}$ de EDTA 50 mM durante 15 min con ayuda de vortex para disgregar las células, posterior a esto se centrifugaron a 1200 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en $20 \mu\text{L}$ de PBS. Posterior a esto los $20 \mu\text{L}$ de células disgregadas aisladas de los tumores fueron colocadas en laminillas cubreobjetos y secadas a 50°C durante 30 minutos. Las células se permeabilizaron con 0.5% de tritón X100 durante 15 minutos, el cual se retiró por medio de tres lavados con PBS. Se les adicionó cloruro de amonio 50mM por 15 minutos para disminuir la autofluorescencia, se lavaron 2 veces con PBS y se dejaron secar; a su vez a estas células se le agregó peróxido de hidrogeno al 0.5% en metanol para inhibir la actividad peroxidasa endógena de las células. Las células adheridas a la laminilla se incubaron con $20 \mu\text{L}$ suero hiperinmune de conejo anti-rotavirus, el cual reconoce proteínas estructurales de rotavirus (1:3000 en PBS) en una cámara húmeda a 37°C durante una hora. Posterior a esto, el anticuerpo primario fue retirado por medio de 3 lavados con PBS, luego se añadieron $20 \mu\text{L}$ de anticuerpo secundario anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa (HRP 0.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubaron por 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Se lavaron con PBS 2 veces y se revelaron con una solución compuesta por aminoetilcarbazol 0.64mg/ml (AEC), buffer acetato pH 5 (acetato de sodio 0.030 M- ácido acético 0.012 M) y peróxido de hidrógeno al 0.36 %, por 45 minutos. Por último, se realizó un lavado con PBS 2 veces, para retirar el exceso de carbazol. Posterior a los lavados, las laminillas se voltearon con $20 \mu\text{L}$ de glicerol al 80% y fueron selladas con esmalte y se fotografiaron en 10 campos representativos con un microscopio Van Guard con un lente de 100X y 40X.

Para determinar el porcentaje de infección se contaron las células positivas y negativas por medio del programa Image J, el número de células positivas se dividió en el total de células, obteniendo como resultado el porcentaje de antígenos positivos de rotavirus y como control se analizaron las células del tumor tratado con PBS.

8.1.6 Fluorescencia

Para determinar la superposición de fluorescencia/carbazol de antígenos relacionados con muerte celular y antígenos rotavirales en los tumores aislados del modelo *in vivo*, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia. Para esto, las láminas reveladas con carbazol, fueron lavadas con PBS, y se les agregó cloruro de amonio 50mM durante 10 minutos, de esta manera se garantizó una disminución de la autofluorescencia de las células de las muestras. A continuación se adicionó anticuerpo primario policlonal (anti-Hsp90, -NSP4, -NSP5, -NSP2, -NSP6 o -PDI, en dilución 1:3000) o monoclonales (anti-PARP, -BID, -BAX, -COX2, -COX4, -Cas3, -Cas7, -Cas9, -citocromo C, -Smac, 0.2µg/ml) durante una hora a 37°C. Posteriormente se realizó dos lavados con PBS y se adicionó anticuerpos secundarios conjugados con FITC o Alexa 568 anti-conejo, anti-cobayo o anti-ratón (0.27µg/ml) durante una hora a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Se realizaron 2 lavados con PBS y las muestras fueron volteadas sobre glicerol al 80% y selladas con esmalte, para ser fotografiadas en un microscopio de fluorescencia (Van Guard) utilizando un lente de 100X y 40X.

8.1.7 Western Blot

Para determinar la presencia de proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus WTEW en las células procedentes de tumores del modelo *in vivo*, se tomó 1 ml de las células extraídas de los tumores aislados de ratones inoculados o no inoculados con el rotavirus intratumoral. Las células se lisaron por medio de la adición de 3 ml de buffer Leammli (SDS 2%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.004%, tris-HCl 0.125M, pH:6.8) el lisado fue centrifugado a 12000 x g durante 30 minutos. Posterior a esto las proteínas se precipitaron con 10% p/v de polietilenglicol durante una noche a temperatura ambiente, luego fueron centrifugadas a 12000 x g durante 30 minutos y se retiró el sobrenadante. Las proteínas se lavaron con etanol al 70% y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Posterior a la precipitación con etanol, se centrifugaron las proteínas a 12000 x g durante 30 minutos, y se retiró el sobrenadante, a continuación las proteínas fueron resuspendidas en 5ml de PBS (pH 7.2) y se cuantificó la proteína total por medio de un espectrofotómetro a 280 nm y se diluyeron las muestras hasta llegar a una cantidad de proteína total de 40µg. Se agregó nuevamente buffer Leammli y se corrieron las muestras en electroforesis SDS-PAGE al 10% (20 mA). Posterior a la electroforesis las muestras fueron transferidas a una membrana PVDF (60mA toda la noche). Luego, la membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% p/v y lavada 3 veces con PBS, se agregaron los sueros hiperinmunes anti-rotavirus (1:1000), anti-NSP4, -NSP5, -NSP2 o -NSP6, durante una hora a temperatura ambiente. Luego la membrana se lavó 3 veces con PBS y se agregó anticuerpo anti-ratón o anti-conejo conjugado con HRP (1:1500). Por último, se revelaron por medio de exposición de membrana fotográfica con kit de luminol (Santa cruz biotechnology). Se usaron como control, lisados virales de células MA104 y lisados de células tumorales procedentes del ratón sin infectar.

8.1.8 Elisa de Captura

Se determinó la presencia de anticuerpos anti-rotavirales en los plasmas sanguíneos de los ratones a los cuales se les aplicó el rotavirus WTEW mediante un ensayo de ELISA de captura. Para esto, a placas de 96 pozos se adicionó suero hiperinmune de cobayo que reconoce proteínas estructurales del rotavirus (1:1000), como control positivo, o el suero de ratón al cual se le generó tumor y luego se inoculó con el rotavirus

WTEW (1:500). Se incubaron a 37°C durante una hora, posteriormente se bloquearon con leche descremada al 5% durante una hora a 37°C, se lavaron los pozos con 200µL de PBS tres veces y se adicionaron 100 µL de lisados de rotavirus. Se incubó a 4°C durante toda la noche, se lavó con PBS tres veces y se adicionó suero hiperinmune de conejo o cabra anti-rotavirus (1:2000). Estos fueron incubados a 37°C durante una hora. A continuación, se lavaron 3 veces con PBS y posterior a esto se agregó anticuerpo anti-conejo o anti-cabra conjugado con peroxidasa HRP (1:1500=0.13µg/ml). El experimento fue revelado utilizando como sustrato OPD (O-fenilenediámina dihidrocloruro) diluido en buffer citrato pH 5. Como control fueron usados los lisados tumorales de ratones no infectados intratumoralmete o lisados celulares de células infectadas.

Para determinar la presencia de antígenos rotavirales no estructurales, los tumores aislados de los ratones infectados o no infectados intratumoralmente con el virus WTEW, fueron lisados con buffer RIPA pH 8.0 (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 50 Mm Tris base) y se preservaron en congelación a -20°C hasta su uso. Posterior a esto en placas de 96 pozos se utilizó como anticuerpo de captura sueros hiperinmunes anti- NSP5 y NSP3 de cobayo (dilución 1:1000), Se incubaron a 37°C durante una hora, posteriormente se bloquearon con leche descremada al 5% durante una hora a 37°C, se lavaron los pozos con 200µL de PBS tres veces, y se adicionaron 100 µL de lisados celulares procedentes de los tumores aislados del modelo *in vivo* Balb/c SP2/O-Ag14. Se incubó a 4°C durante toda la noche, se lavó con PBS tres veces, se adicionó suero hiperinmune de ratón anti-NSP5 y NSP3 (dilución 1:1000) y se incubo a 37°C durante una hora. Se lavaron 3 veces con PBS y se agregó anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa HRP (1:1500=0.13µg/ml). El experimento fue revelado utilizando como sustrato OPD (O-fenilenediámina dihidrocloruro) diluido en buffer citrato pH 5. Como control fueron usados los lisados tumorales de ratones no infectados intratumoralmete o lisados celulares de células infectadas. se leyó la absorbancia de los pozos a 492 nm en un espectrofotómetro.

8.1.9 Ensayo de TUNEL

Para determinar si la infección rotaviral induce muerte celular por degradación de material genético se utilizó el kit “*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*” de Roche (Cat. No. 11684795910). Para esto los cortes histológicos del tumor fueron desparafinados por medio de un gradiente de Xileno y etanol 95%,90%,80% y 70% posterior a esto los cortes histológicos fueron lavados 2 veces con agua destilada. A continuación de añadieron 2 lavados con buffer PBS pH:7.2, para luego agregar una solución de permeabilización la cual contenía Triton X-100 a una concentración de 0.1% preparado en buffer citrato pH:6, por último se agregaron 50 µL de mezcla de reacción TUNEL según lo indicado en el protocolo, se encubaron los cortes histológicos con la muestra a 37 °C durante 60 minutos en cámara húmeda, luego las muestras fueron selladas en ausencia de luz con cubre objetos y glicerol al 30% para ser analizadas y fotografiadas en un microscopio de fluorescencia (Van Guard).

8.1.10 Sujetos de Estudio, Tamaño de Muestra y Recolección

La población empleada fueron ratones Balb/c machos de 25 a 30 gramos de peso al momento de su utilización y 6 semanas de edad. Se seleccionaron un total de 8 ratones y estos ratones fueron comprados en el biotério del Instituto Nacional de Salud.

8.1.11 Procedimientos para Garantizar Aspectos Éticos en las Investigaciones con Animales

Los procedimientos utilizados en este proyecto se hicieron acatando las normas sobre uso y cuidado de animales de laboratorio establecidos en la resolución No.008430 de 1993

El presente proyecto vincula ratones Balb/c. los productos derivados del manejo de estos ratones y de los diferentes tratamientos fueron descartados en condiciones especiales momentos después de realizar los experimentos, evitando el posible contacto con otros humanos. Los elementos cortopunzantes fueron recolectados en guardianes. El material de laboratorio usado como pipetas guantes y demás se recolectó en bolsas rojas de material biológico según las indicaciones establecidas por el Ministerio de la Protección Social (resolución No 008430 de 1993), para finalmente ser descartados por la empresa contratada por la Universidad Nacional de Colombia para dicha actividad.

Los materiales usados en el laboratorio, contaminados con rotavirus como puntas o tubos eppendorf, entre otros materiales contaminados con rotavirus, se depositaron en hipoclorito para la inactivación del rotavirus remanente en dichos materiales. Luego se descartaron en recipientes de plástico de sellado hermético, para posteriormente ser entregados a la empresa contratada por la universidad para el manejo de residuos contaminados, dando a conocer a la empresa el tipo de residuos que se le entrega.

8.1.12 Estadística

Se usaron los programas Sigma Plot 10.0 y GraphPad Prism 6 para realizar los análisis estadísticos de los datos obtenidos en el estudio, usando estadística descriptiva para realizar los análisis de significancia, media y desviación estándar.

9. RESULTADOS

9.1. El aislamiento Rotaviral WTEW tiene mayor concentración viral respecto a Ecwt y Wt1-5.

Inicialmente, habían tres aislamientos rotavirales (WTEW, Wt1-5 y EcWt-O) de los cuales se quiso determinar cual estaba en mayor concentración para inocular intratumoralmente los ratones. Para esto, se

realizó el ensayo de cuantificación de Unidades Formadoras de Foco (UFF) en la línea tumoral de mieloma de ratón Sp2/O-Ag14. Se infectaron aproximadamente 2×10^5 células en un volumen de 300 μ l de medio RPMI, usando diluciones 1:750, 1:1500, 1:3000 de los 3 aislamientos rotavirales. pasadas 12 horas post infección (h.p.i) se analizó la presencia de los antígenos estructurales de rotavirus mediante inmunofluorescencia. De este ensayo, se obtuvieron los datos que a continuación se describen. La mayor infectividad con el virus WTEW, usando una dilución de 1:3000, donde aproximadamente el 57.558% de las células eran positivas para antígenos rotavirales. Para la dilución 1:15 y 1:750 la infectividad fue de 78.5842% y 95.2325% respectivamente. En la dilución 1:750 se observó lisis y fragmentación celular acentuada. El aislado rotaviral Wt1-5 presentó valores de 1:3000 =42.58%, 1:1500 =54.35% y 1:750 =75.45%. Con el aislado rotaviral Ecwt se obtuvieron valores de 1:3000 =25.45%, 1:1500=41.57% y 1:750 =53.82% (figura 4). Por último, se calcularon los títulos virales por medio de la ecuación [título=volumen x conteo células positivas x dilución x número de fotos] obteniendo como resultados los siguientes títulos virales par las diluciones anteriormente mencionadas (Tabla 2). A partir del ensayo de inmunofluorescencia se concluyó que el aislado rotaviral WTEW logró una infección aproximadamente del 50% con una dilución menor en comparación con los aislados Wt1-5 y Ecwt.

Tabla 2 Títulos virales de las cepas rotavirales

Cepa viral	Titulo viral
WTEW	3.3×10^8 UFF/ml
WT 1-5	8.9×10^7 UFF/ml
Ecwt	3.8×10^7 UFF/ml

9.2. La infección con la cepa rotaviral WTEW en el modelo in vivo Balb/c SP2 Ag14/0 muestra diferencias en el volumen tumoral pero no en el peso a través de los días.

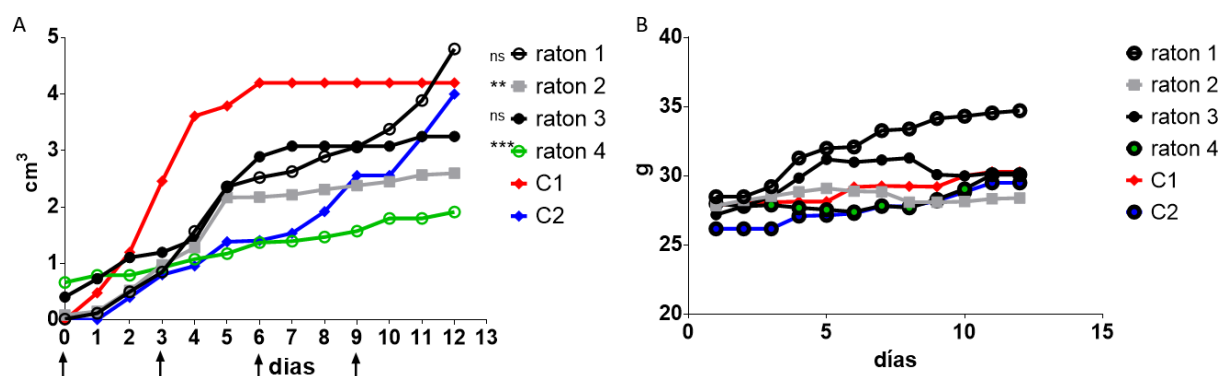


Figura4 Existen diferencias en el volumen pero no en el peso de los ratones inoculados intratumoralmente con el rotavirus WTEW. Ratones Balb/c de 6 semanas de edad y peso promedio de 30g (n=8) fueron inmuno-suprimidos localmente por medio de la inoculación de Pristan[®] 100 μ L (78.3 mg) subdérmico en el área abdominal, 5 días posterior a la inmunosupresión fueron inoculados en el flanco con 1×10^6 células Sp2/O-Ag14 en 100 μ L de medio de cultivo RPMI en la misma área. Una vez los tumores desarrollaron un volumen aproximado de 0.12cm³ los tumores fueron inoculados con 3300 partículas virales en 100 μ L de PBS cada 3 días para un total de 3 dosis, como control se inoculo PBS estéril en los ratones control. Los ratones fueron monitoreados para evaluar el crecimiento tumoral y se realizó registro del peso total y el volumen tumoral de cada ratón. (A) graficas representativas volumen tumoral (cm³) en los ratones inoculados intratumoralmente con rotavirus WTEW calculados por medio de la ecuación $V=abx^2/2$ [117] (B) graficas representativas del cambio de peso (g) en los ratones inoculados intratumoralmente con rotavirus WTEW.

Para la obtención de los anteriores resultados, ratones Balb/c de 6 semanas de edad (n=8) fueron inmunosuprimidos localmente por medio de la inoculación de 78.3 mg de 2, 6, 10,14-tetrametilpentadecano (Pristan[®]) subdérmico en el área abdominal. Posterior a 5 días de inmunosupresión fueron inoculados con 1×10^6 células Sp2/0-Ag14 en 100 μ L, de manera subdérmica en la misma área. Se monitorearon las variables correspondientes al peso total del ratón y volumen tumoral teniendo en cuenta que la forma aproximada de los tumores era la de una esfera usando la ecuación $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ [117, 118]. Cuando el volumen del tumor llegó aproximadamente a 0.12 cm³ se inocularon 3300 partículas virales de rotavirus WTEW o PBS en el ratón control cada 3 días para un total de 3 dosis de manera intratumoral.

Se observaron diferencias significativas en el volumen al comparar los ratones tratados con los ratones control. En los ratones control los volúmenes tumorales eran de 4.2 cm³ para el control 1 y 4 cm³ para el ratón control 2 al finalizar el ensayo. Para los ratones tratados los volúmenes tumorales finales fueron de 4.8 cm³, 2.6 cm³, 3.25 cm³ y 1.91 cm³ respectivamente como se muestra en la gráfica. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el peso total de los ratones a excepción del ratón 1 al ser comparados con los ratones control.

9.3 Hay presencia de antígenos rotavirales en los tumores extraídos del modelo murino Balb/c.

Posterior a las 3 dosis de rotavirus inoculadas intratumoralmente, a los ratones (n=8) se les practicó dislocación cervical como método de eutanasia, posteriormente se recolectaron los tumores de cada uno de los ratones. Una sección de estos tumores fue tomada para realizar cortes histológicos posterior a la fijación por medio de paraformaldehído al 10%. Después de la dislocación cervical, la sangre de los ratones fue recolectada por medio de decapitación y luego preservada con azida de sodio a 4°C.

Se realizó una disgregación de las células por medio de separación mecánica, macerando suave en presencia de suero RPMI, las células fueron fijadas por medio de la adición de paraformaldehído al 4%, 30 min a 4°C, posterior a esto las células fueron precipitadas por centrifugación, para retirar el paraformaldehído y fueron resuspendidas en PBS. Se puso 20 μ L de células ($\approx 4.8 \times 10^6$) en laminilla cubre objetos, se trataron con Triton X-100. Las células fueron tratadas con cloruro de amonio 50mM y luego con una solución de peróxido de hidrógeno en metanol al 0.5%. Se incubaron con sueros hiperinmunes anti-rotavirus y anticuerpos secundarios conjugados con FITC, se tomaron 15 fotos representativas de cada uno de los ensayos de inmunofluorescencia y las células fueron contadas por medio del programa de imageJ. Los resultados obtenidos demostraron un porcentaje de células positivas para rotavirus entre el 50% y 60% en todas las células extraídas de los tumores procedentes del modelo murino. Al cuantificar las intensidades de fluorescencia media, como una medida indirecta de la cantidad de antígeno, se observó unas unidades de intensidad media mayores a 50 a comparación de la intensidad media observada en las muestras control, las cuales eran menor a 20 (Figura 5 Ay B). Los cortes histológicos de cada uno de los tumores se analizaron mediante inmunofluorescencia con sueros hiperinmunes anti-NSP5 y -NSP3 como se describió en materiales y métodos; los resultados obtenidos mostraron presencia de estos antígenos en los cortes histológicos procedentes de los tumores extraídos del modelo murino, mientras que en los cortes histológicos procedentes de los tumores control hubo ausencia de fluorescencia (figura 5 D).

Para probar la presencia de proteínas no estructurales rotavirales se realizó un ensayo de ELISA de captura, para el cual se sembraron 200 μ L de suero hiperinmune anti-NSP5 de ratón como anticuerpo de captura, a continuación se adicionaron los lisados tumorales procedentes del modelo murino y se adicionaron anticuerpos policlonales anti-NSP5 de conejo, finalmente se agregó anticuerpo anti-conejo conjugado con la enzima HRP, para revelar con el sustrato OPD y se realizó la lectura por medio de espectrofotómetro, como resultados se obtuvieron absorbancias de 0.17, 0.16 y 0.1 para los lisados tumorales provenientes de

los tumores 1,5 y 6 respectivamente, a comparación de los controles en los cuales la absorbancia obtenida fue de 0 (figura 5 E)

Las muestras tumorales extraídas por maceración en presencia de medio RPMI, fueron lisadas por medio de buffer Leammli y fueron corridas en electroforesis SDS-PAGE y transferidas a una membrana de PVDF durante toda la noche. La membrana se incubó con anticuerpos policlonales para las proteínas estructurales y no estructurales rotavirales y anticuerpo secundario conjugado con la enzima HRP. Se reveló con el sustrato luminol. Como control positivo se usaron lisados virales de células MA104 (Figura 5 C y F).

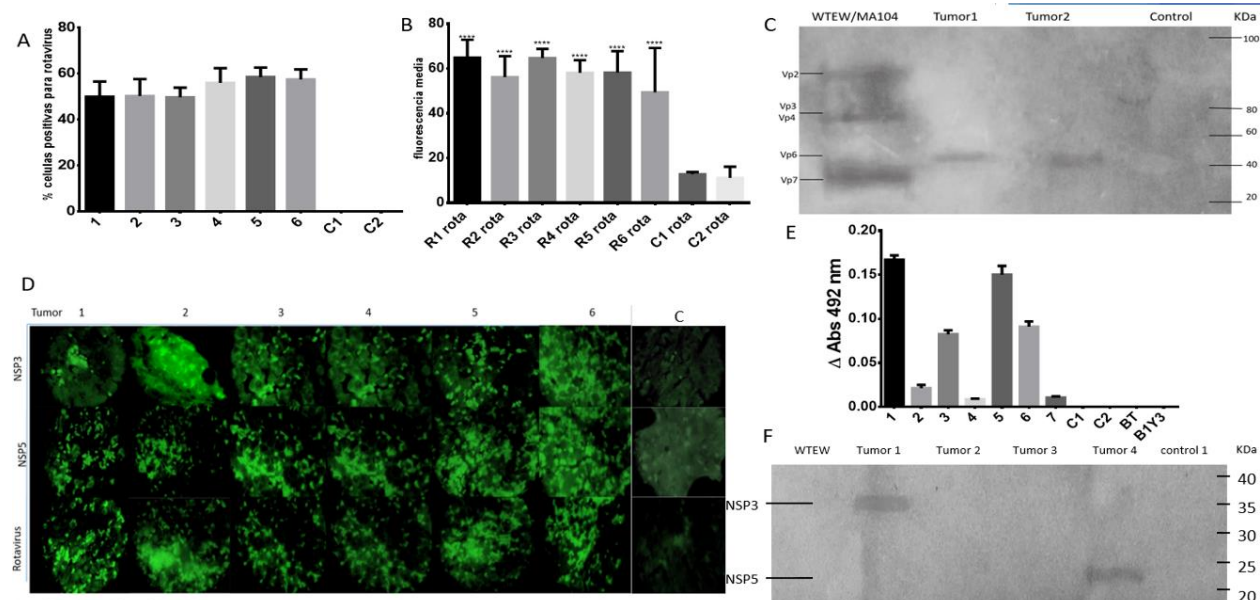


Figura 5 Hay presencia de antígenos rotavirales en los tumores del modelo murino (A) células rotavirus positivas en inmunofluorescencia. Los tumores fueron disgregados por maceración en presencia de medio de cultivo y sometidos a ensayos de inmunofluorescencia para detectar antígenos rotavirales estructurales, posterior a esto las muestras fueron fotografiadas y se cuantificaron las células positivas para estos antígenos en el programa imageJ. (B) análisis de intensidad de fluorescencia media de inmunofluorescencia para con anticuerpos anti-rotavirus. (C) Western blot antígenos rotavirales. Los tumores fueron lisados por medio de buffer Leammli para realizar un ensayo de electroforesis SDS-PAGE, posterior a esto se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF y se realizó un ensayo de Western blot con anticuerpos anti-rotavirus se uso como control positivo lisados virales de células MA104. (D) imágenes representativas inmunofluorescencia rotavirus, NSP5 y NSP3. (E) células lisadas por medio de buffer ripa fueron sometidas a ensayo Elisa de captura para comprobar la presencia del antígeno no estructural NSP5. (BT= blanco total, B1y3= control anticuerpo de captura anticuerpo secundario)(F) células lisadas por medio de buffer ripa fueron sometidas a un ensayo Western blot para probar la presencia de los antígenos no estructurales NSP3 y NSP5.

En los tumores de los ratones que fueron inoculados intratumoralmente con el rotavirus WTEW se observó presencia de los antígenos rotavirales durante los ensayos de Western blot, Elisa de captura e inmunofluorescencia, dando como resultados un porcentaje infectividad media de 1=49.97%, 2=50.26%, 3=49.72%, 4=55.98%, 5=58.50% y 6=57.48% al realizar el conteo de las fotos de inmunofluorescencia. Estos resultados fueron contrastados con las intensidades de fluorescencia media de las fotografías en las que se realizó el conteo de células positivas para antígenos rotavirales. Como resultado se obtuvo una alta significancia de intensidad de fluorescencia media con respecto al control ($p < 0.0001$), las medias de fluorescencia fueron 1=64.88, 2=56.22, 3=64.78, 4=58.15, 5=58.20 y 6= 49.41. Por otro lado los ratones control inoculado con PBS presentaron intensidades de fluorescencia media de C1=12.8 y C2= 11.19.

En el Western Blot se detectó la presencia de antígenos rotavirales en 2 tumores. Teniendo en cuenta los pesos aproximados de las proteínas rotavirales reportados en uniprot (Tabla 3), se observó la presencia de las proteínas estructurales VP2-4, VP6 y VP7 en el control positivo y de la proteína VP6 en los tumores de los ratones infectados.

Tabla 3 pesos de las proteínas rotavirales evaluadas

Proteína	Peso KDa
VP1	125.208
VP2	102.741
VP3	98.069
VP4	86.777
VP6	44.873
VP7	37.198
NSP3	36.425
NSP5	21.725

Por otro lado, se observaron antígenos rotavirales no estructurales presentes únicamente en el ciclo replicativo del virus, en los ensayos de inmunofluorescencia, Western Blot y Elisa. En el Western Blot se detectó la proteína NSP3 en el tumor 1 y la proteína NSP5 en el tumor 4, en los otros dos tumores no se logró observar la presencia de ninguno de estas dos proteínas. En el ensayo de Elisa se encontró la proteína NSP5, la cual tiene papel en la formación del viroplasma expresada en unidades de absorbancia: 1=0,167, 3=0,082, 5=0,15 y 6=0,1.

9.4 Los ratones Balb/c Sp2/O-Ag14 tratados con rotavirus WTEW presentan bajo título de anticuerpos.

Para analizar si los ratones inoculados con el rotavirus WTEW intratumoralmente habían generado anticuerpos contra el rotavirus, los sueros fueron usados como anticuerpo de captura en un ensayo de Elisa (1:5), como control positivo del anticuerpo de captura se usó anticuerpo policlonal anti-rotavirus (1:500) y como antígenos se aplicó lisados de células MA104 infectadas con rotavirus. Los resultados del ELISA

mostraron una baja absorbancia, indicando que se captó poco antígeno rotaviral, incluido el control positivo. las absorbancias de los ratones 3 y 5 fueron: 3=0.109 y 5= 0.055 y del control positivo de 0.15

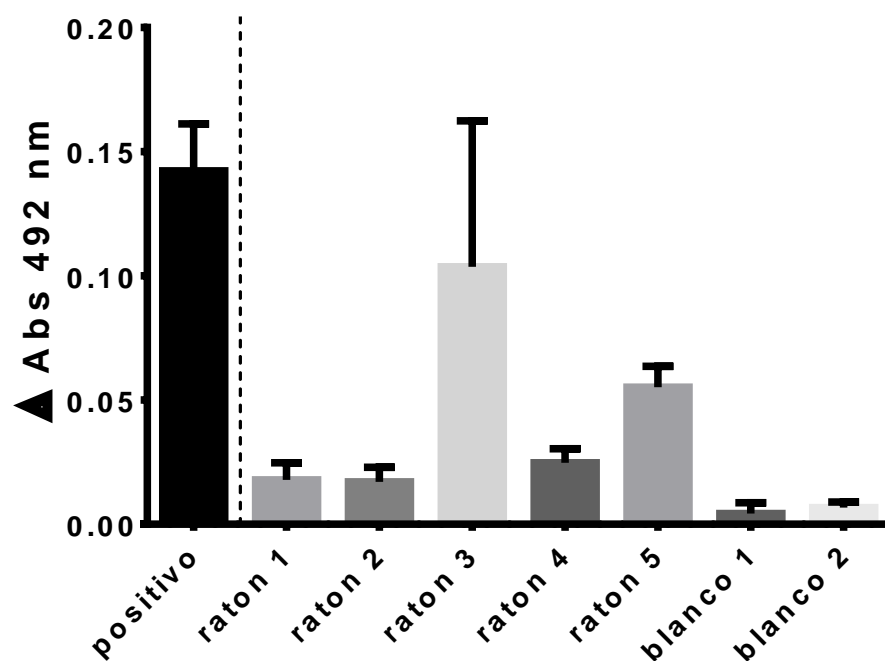


Figura 6 Presencia de anticuerpos anti-rotavirus en plasmas sanguíneo del modelo murino. Los plasmas sanguíneos extraídos del modelo murino fueron colectados por medio de decapitación, posterior a cepación y recolección por medio de centrifugación fueron usados para realizar un ensayo de Elisa, siendo usados como anticuerpo de captura los plasmas sanguíneo y como control positivo fue usado anticuerpo policlonal antirotavirus.

Como resultado se obtuvo una baja presencia de anticuerpos anti-rotavirus en los plasmas sanguíneos de los ratones, con excepción de los ratones 3 y 5 los cuales evidenciaron una presencia de anticuerpos. La media de unidades de absorbancia en las dos muestras positivas fueron 3=0.109 y 5= 0.055 a comparación del control positivo el cual tiene una media de absorbancia de 0.15.

9.5 La presencia de antígenos rotavirales coincide con la expresión de señales de muerte celular.

Con el fin de determinar si los tumores inoculados con el virus WTEW expresaban antígenos relacionados con muerte celular, se pusieron células ($\approx 4.8 \times 10^6$) en láminas cubre objetos, se permeabilizaron con Triton X-100, se lavaron y fueron tratadas con cloruro de amonio 50mM. Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos policlonales anti-rotavirus, y anticuerpos monoclonales anti-BID, BAX, Cas3, Cas7, Cas9, citocromo C, Smac, y anticuerpos secundarios conjugados con FITC y Alexa 568 respectivamente, para generar una doble marcación en las células. Se tomaron 15 fotos representativas de cada uno de los ensayos de inmunofluorescencia y las células positivas para la fluorescencia fueron contadas por medio del programa de imageJ (figura 8).

En los resultados obtenidos se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$) en la expresión de antígenos de señales de muerte celular y antígenos rotavirales, obteniendo así una media de infección de 49.04% en los ratones tratados con el virus WTEW y de 0% en los ratones control. Por otro lado, se observó una mayor expresión de los antígenos relacionados con muerte celular en los ratones infectados intratumoralmente con el rotavirus WTEW, con respecto a los ratones control inoculados con PBS. Igualmente, se realizó una

determinación de la fluorescencia media de las fotos en las que se realizó el conteo en imageJ, siendo la fluorescencia media un indicio semi-cuantitativo de la cantidad de antígeno presente en las células. Los datos de la media de porcentaje de células positivas para el antígeno y fluorescencia media para las fotos están reportados en la tabla 4 (figura 7 A y B).

Tabla 4 Medias de inmunofluorescencia

Antígeno	Media de % de células positivas	Media de Fluorescencia media
Rotavirus	49,04	58,61
Rotavirus control	0	12
Bax	43,41	44,68
Bax control	9,648	13,11
Bid	42,11	38,57
Bid control	7,819	5,111
Citocromo c	38,4	41,77
Citocromo c control	12,81	12,57
Smac	32,55	42,72
Smac control	5,42	16,43
Cas9	34,41	42,42
Cas9 control	6,76	9,539
Cas7	35,85	41,95
Cas7 control	17,25	8,4
Cas3	38,31	45,88
Cas3 control	10,6	5,635
Bcl2	31,77	38,99
Bcl2 control	10,27	5,402

En los cálculos de significancia, respecto al porcentaje de células positivas para cada antígeno, se observó que todos los antígenos obtuvieron valores de significancia superior a uno respecto a los conteos realizados en los ratones control ($p < 0.001$). Esto demuestra una diferencia significativa en la expresión de antígenos relacionados con muerte celular. Entre los antígenos evaluados en los conteos celulares, el único antígeno que no tuvo significancia estadística fue caspasa 7 debido a que en las muestras control este antígeno se encontraba activo (C1=19,461%, C2=14,851%). El valor más alto en las muestras infectadas con el virus WTEW fue la del ratón 5 (47.892%).

Al hacer superposición de las fotografías tomadas con el filtro verde y filtro rojo, se encontró coincidencia en la localización de las células positivas para antígenos rotavirales con las células positivas para cada uno de los antígenos relacionados con muerte celular (figura 7 C y D o Anexo A). Por otro lado, en uno de los ratones inoculados con el virus WTEW (raton1) se dio la aparición de tumores metastásicos, los cuales fueron extraídos por medio del mismo proceso que los tumores primarios. Además, estos fueron probados por medio de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, tanto para los antígenos rotavirales como para los antígenos Bax, citocromo C y Cas3. De los resultados obtenidos de los ensayos realizados en metástasis, se logró observar un porcentaje de células positivas de $\approx 40\%$ para antígenos rotavirales y un porcentaje de células positivas entre el 35% y 40% para los antígenos Bax, citocromo C y Cas3. Al superponer las

imágenes, la locación de dichos antígenos, se dio cerca o en el mismo lugar a los antígenos rotavirales.
(Anexo A figuras 1,3,7)

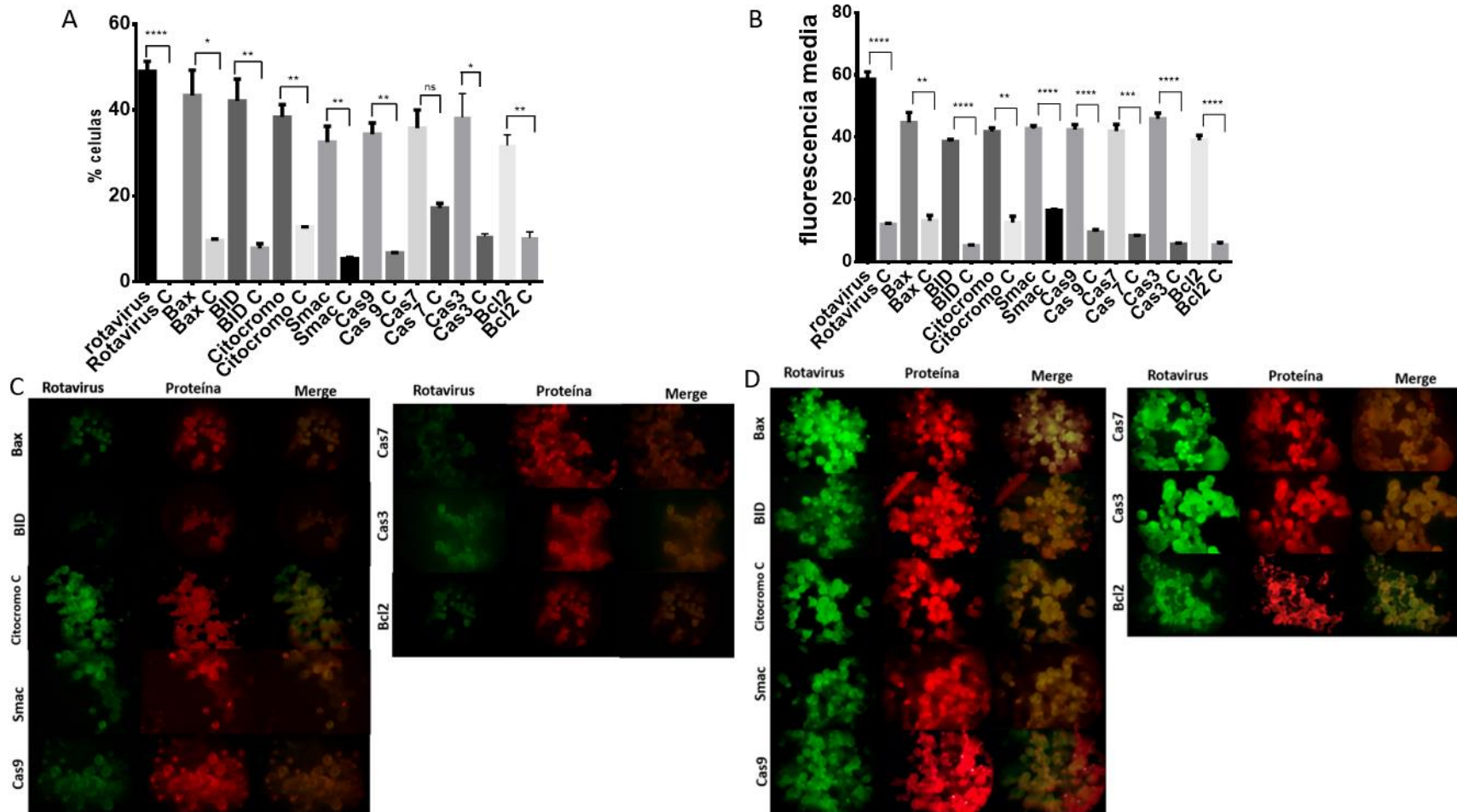


Figura 7 Presencia de antígenos relacionados con muerte celular en tumores extraídos del modelo murino Balb/c SP2 Ag14/0 infectados y no infectados con virus WTEW. Los tumores de los ratones infectados y ratones no infectados fueron extraídos posterior al eutanasia, estos fueron sometidos a ensayos de inmunofluorescencia por medio de anticuerpos policlonales para antígenos rotavirales y anticuerpos monoclonales anti- Bax, Bid, citocromo c, Smac, cas9, cas7, cas3 y Bcl2, y se agregaron anticuerpos secundarios conjugados con FITC y Alexa 568 (A) porcentajes de células positivas para los antígenos rotavirales y los antígenos relacionados con muerte celular, comparados contra los ratones control. (B) fluorescencia media fotografías tomados en las inmunofluorescencia comparada contra los ratones control. (C) fotografías representativas de los antígenos rotavirales y relacionados con muerte celular en los ratones control inoculados con PBS. (D) fotografías representativas de los antígenos rotavirales y relacionados con muerte celular en los ratones inoculados con el virus WTEW.

9.6 La infección rotaviral induce muerte celular por degradación de material genético.

Debido a que se observó la presencia de células positivas para los antígenos caspasa 3, se quiso determinar si existía degradación del material genético. Para esto, se realizó un ensayo de TUNEL utilizando el kit “*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*” de Roche en cortes histológicos de los seis tumores de los ratones infectados con el virus WTEW. Las láminas de patología fueron desparafinadas por medio de la adición de un gradiente xileno-etanol del 95% al 70%, fueron lavadas con buffer PBS, luego se agregó Triton X-100 al 10% en buffer citrato. Por último, se agregaron 50 μ L de mezcla de reacción TUNEL, se encubieron los cortes histológicos a 37 °C durante 60 minutos en cámara húmeda y luego las muestras fueron selladas con cubre objetos y glicerol al 30% para ser analizadas y fotografiadas en un microscopio de fluorescencia.

Se detectaron antígenos rotavirales mediante inmunohistoquímica utilizando sueros hiperinmunes anti-rotavirus, como anticuerpo secundario fue añadido anticuerpo anti-conejo conjugado con la enzima HRP y el sustrato usado para la enzima fue Carbazol.

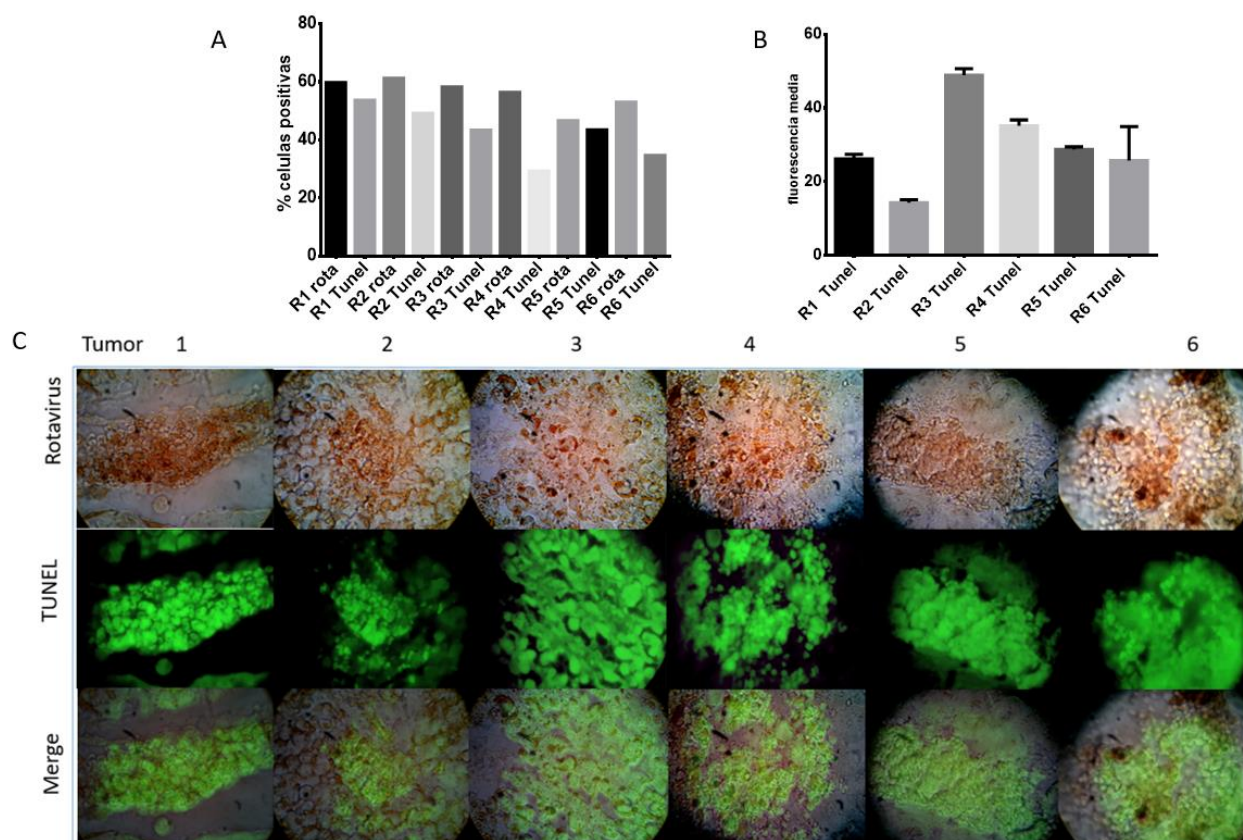


Figura 8 Degradación del material genético en los tumores infectados con el virus WTEW. Cortes histológicos provenientes de los tumores aislados del modelo murino Balb/c Sp2/0-Ag14 infectados con el virus WTEW fueron sometidos ensayos de inmunohistoquímica contra antígeno rotavirales y TUNEL. (A) porcentaje de células rotavirus y TUNEL positivas. (B) fluorescencia media de las fotografías tomadas en el ensayo de TUNEL para cada uno de los seis tumores. (C) imágenes representativas de los ensayos de inmunohistoquímica y TUNEL de los seis tumores.

En los resultados obtenidos se observan porcentajes de células positivas para los antígenos rotavirales entre el 40% y el 60% para cada uno de los 6 cortes histológicos provenientes de los tumores extraídos del modelo

murino. Por otro lado, el porcentaje de células positivas para el ensayo de TUNEL fue de 1:53.6%, 2: 49.11%, 3:43.38%, 4:29.21%, 5: 43.47% y 6: 34.67%. Estos valores son cercanos al porcentaje de células positivas de la infección por rotavirus (49.61%-59.74%), a excepción de los tumores 4 y 6 cuyos valores fueron de 29.21% y 34.67% respectivamente.

Al superponer las fotografías de los ensayos de inmunohistoquímica y TUNEL se observó una coincidencia entre las células positivas para rotavirus y las células positivas para el ensayo de TUNEL. Por último, se realizó una cuantificación de la fluorescencia media de las imágenes tomadas de cada uno de los tumores para el ensayo de TUNEL, en los cuales se observó un comportamiento no lineal de la fluorescencia media de las imágenes al ser comparada con los porcentajes de células positivas para el ensayo de TUNEL.

10. DISCUSIÓN

En los últimos años se han intentado encontrar alternativas para el tratamiento contra cáncer con el fin de lograr mayor efectividad en las terapias convencionales tales como radioterapia y quimioterapia, además de una menor cantidad de efectos adversos causados por estos. Una de las alternativas empleadas para el tratamiento contra el cáncer es la viro-terapia oncolítica donde se usa como herramienta la replicación viral, la cual necesita una célula hospedadora como medio de replicación del material genético y la presencia de las proteínas virales y de membrana celular. Adicionalmente, todos los estudios realizados con virus oncolíticos han delimitado las características que deben ser cumplidas por estos para entrar en la categoría de oncolíticos, siendo la primera de estas una selectividad por células tumorales, lo cual significa que el virus tenga la capacidad de infectar y replicarse de manera selectiva en las células tumorales sin infectar las células normales. Por otro lado, los virus oncolíticos ideales deben tener la capacidad de generar una respuesta inmune antitumoral y ser estables genéticamente [119]

El grupo de investigación de biología molecular de virus de la universidad nacional de Colombia, hizo varios aislamientos rotavirales, dentro de estos WTEW, Wt1-5, TRUYO, WMW y Ecwt. Todos mostraron un tropismo por células tumorales. Entre los resultados obtenidos, se ha mostrado que la presencia de las proteínas de choque térmico Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, PDI e integrina $\alpha\beta 3$ localizadas en la membrana citoplasmática, facilitan la infección por rotavirus oncolítico en las líneas celulares U-937, REH y Sp2/0-Ag14 [10, 120].

El objetivo principal del presente estudio fue determinar la capacidad oncolítica de rotavirus WTEW en tumores alogénicos generados a partir de células Sp2/0-Ag14 en ratones Balb/c. Se tuvo en cuenta como antecedente que la cepa viral WTEW infecta y lisa a dicha línea y que era el rotavirus con mayor concentración que se tenía al momento de realizar este trabajo.

En la literatura se reportan distintos medios de inmunosupresión para los modelos murinos de virus oncolíticos tales como la inoculación con corticoides o la inmunosupresión por medio de anticuerpos monoclonales [28]. Se decidió no tomar los corticoides debido a que el uso de estas moléculas puede inducir apoptosis, lo cual sería un interferente para la determinación de la muerte celular inducida por el virus. En cambio, la inoculación intraperitoneal de pristan; un antagonista de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, no posee un efecto residual sobre el crecimiento tumoral [121, 122, 123] y permitió en este proyecto la proliferación de las células tumorales inoculadas en los ratones (Figura 5).

Respecto al crecimiento tumoral, se observaron diferencias en la tasa de crecimiento de los tumores entre los ratones control y los ratones tratados, mas no se observó un efecto de regresión del crecimiento en los tumores como ha sido reportado para reovirus en los ensayos *in-vivo* [28, 124]. Estos resultados sugieren que la acción oncolítica del rotavirus observada *in-vivo*, esta disminuida respecto a lo observado *in vitro* en la línea tumoral. Este comportamiento puede ser debido a que fueron administradas bajas dosis de virus intratumoral (3.3×10^6 UFF/ml=3300 partículas virales, en tres dosis independientes) aunque en la literatura reporta para reovirus inoculaciones intratumorales de 5×10^8 UFF/ml [28]. Adicionalmente, puede jugar un papel importante la presencia de anticuerpos por el efecto inmune anti-rotavirus, como ha sido reportado para el modelo con reovirus [125, 126]. En este trabajo no se analizó el efecto sinérgico entre la actividad anti-tumoral del rotavirus y la del sistema inmune del ratón. Por lo anterior, es necesario en un futuro determinar la infiltración de células del sistema inmune en el tumor como NKs, o evaluar la expresión de moléculas relacionadas con la respuesta inmune como interferón, citoquinas o interleuquinas, debido a que

estos factores podrían potenciar la oncólisis inducida por el rotavirus. Para llevar a cabo los ensayos anteriormente mencionados sería necesario elongar el tiempo del modelo *in vivo*.

Teniendo en cuenta que el volumen y el peso tumoral son medidas indirectas de la cantidad de tejido, de las células y de la vascularización de los tumores, los resultados observados mostraron diferencias en el peso del tejido tumoral extraído entre los ratones tratados y los ratones control. El peso tumoral en los ratones control fue de 6.47 g y 5.3 g, y en los ratones tratados fue de 2.7 g. Por otro lado, en uno de los ratones control se observó vascularización prominente del tumor con una arteria ancha que se desprendía de la arteria femoral. Los tumores en los ratones tratados con el aislado rotaviral no presentaban vascularización semejante probablemente por la disminución en la proliferación celular.

Con el propósito de evaluar el ingreso del virus y su replicación al interior de la célula, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y ELISA para determinar la presencia de las proteínas no estructurales NSP3 y NSP5, ya que estas solo se expresan en la replicación activa del virus y no hacen parte de la estructura física de la partícula viral. Estas proteínas se expresan justo después del ingreso del virus al interior de la célula y su función es inhibir la traducción de proteínas celulares y la formación del viroplasma respectivamente [45, 127, 43] (Figura 6). Los resultados indican que hubo expresión de estas proteínas en las células de los tumores sugiriendo una replicación activa del virus en el modelo *in vivo* [128, 129]; aunque para analizar cuantitativamente la replicación viral, es necesario realizar ensayos de PCR en los cuales se vea un aumento del RNA viral comparando con el RNA inoculado.

Entre los factores que pueden afectar el resultado en el modelo *in vivo*, está el atrapamiento del rotavirus en la matriz extracelular. Se encontraron, por inmunofluorescencia, antígenos rotavirales en el interior de las células al ser permeadas pero a su vez en la periferia de las mismas, lo cual sugiere un atrapamiento del virus en la matriz extracelular conduciendo a una baja dispersión de los nuevos viriones. Lo anterior puede ser debido a la presencia de proteínas o moléculas que pueden interactuar con el rotavirus, tales como ácido siálico contenido en glucoproteínas de la matriz extracelular o integrinas presentes en la superficie de la membrana celular [55, 39, 130].

Se ha reportado que el rotavirus es capaz de inducir la apoptosis por la vía mitocondrial gracias a la actividad de las proteínas no estructurales NSP4 y NSP6, las cuales se ha reportado que tiene la capacidad de provocar la liberación de citocromo c de la mitocondria iniciando así la apoptosis por vía intrínseca. Por otro lado, se ha reportado una exposición de fosfatidilserina en las células tumorales infectadas con rotavirus, y a su vez una degradación del material genético doce horas posterior a la infección con virus tales como el RRV [131]. En este trabajo fueron evaluadas las proteínas Cas3, Cas7, Cas9 Bax, Bid Cas8 citocromo C, Smac diablo y Bcl2, relacionadas con la muerte celular mediada por la vía intrínseca de apoptosis, la cual ha sido reportada para distintas líneas celulares infectadas con cepas rotavirales tales como Caco-2, MA104 y Ht-29. En las células infectadas con el aislamiento rotaviral WTEW se observó un aumento en la expresión de antígenos relacionados con muerte celular y antígenos rotavirales; determinado mediante la cuantificación de la intensidad de fluorescencia media, así como un solapamiento entre ellos; observado en las inmunofluorescencias [132, 133, 114, 131]. Con reovirus, el efecto citolítico en modelos de xenografía de seno *in vivo*, inoculando 5×10^9 pfu/50 μ l dos veces, se reportó regresión tumoral después de la segunda inoculación intratumoral, al día 12 [29] [134].

Finalmente, en este trabajo se observó una degradación del material genético de las células tumorales medido mediante el ensayo de TUNEL. Lo anterior concuerda con lo reportado en la literatura a y a su vez

con los resultados encontrados en el presente estudio, entre los cuales se observó un aumento de los efectores finales caspasa 3 y caspasa 7.

11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

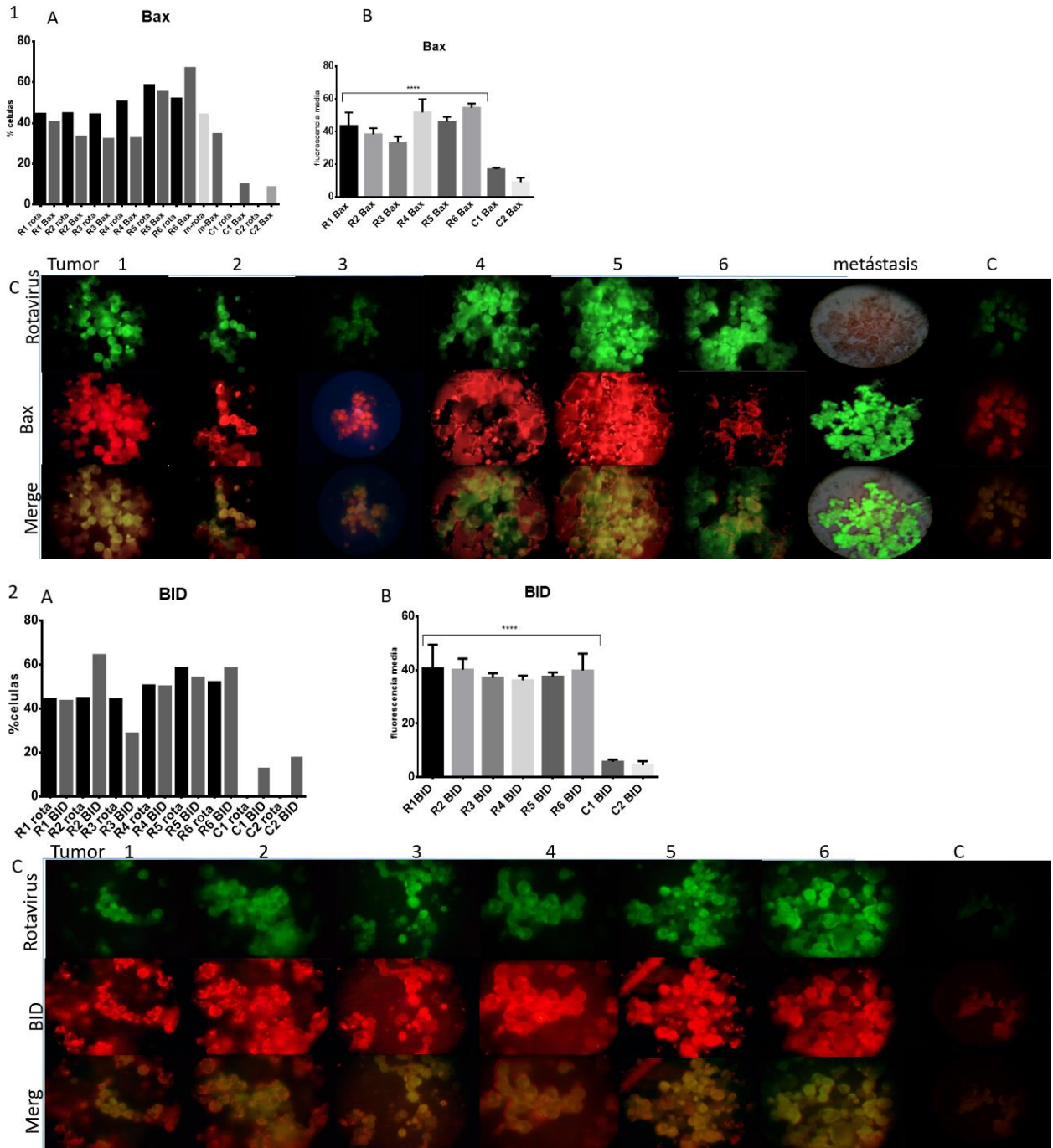
11.1 Conclusiones

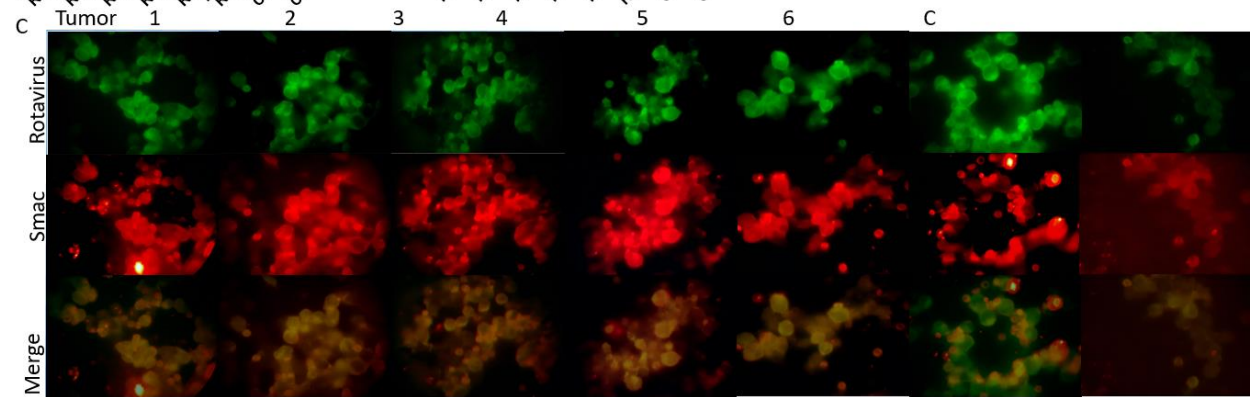
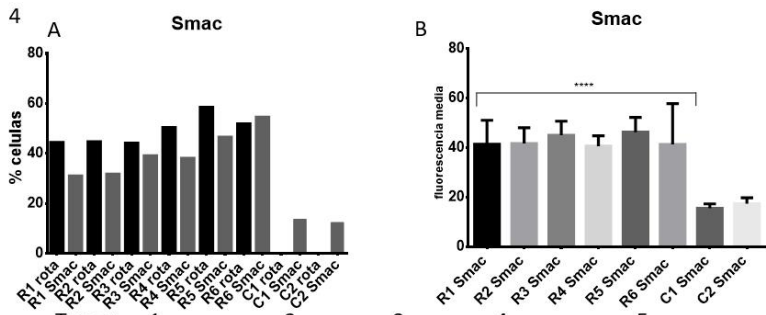
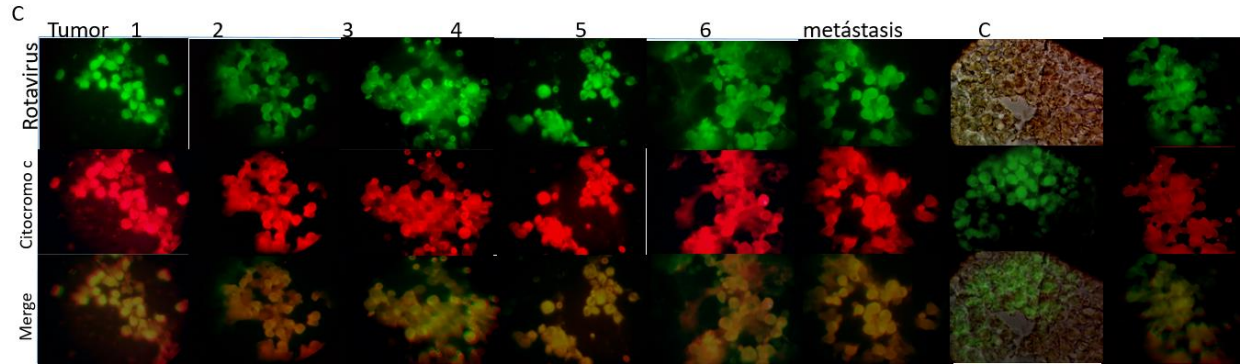
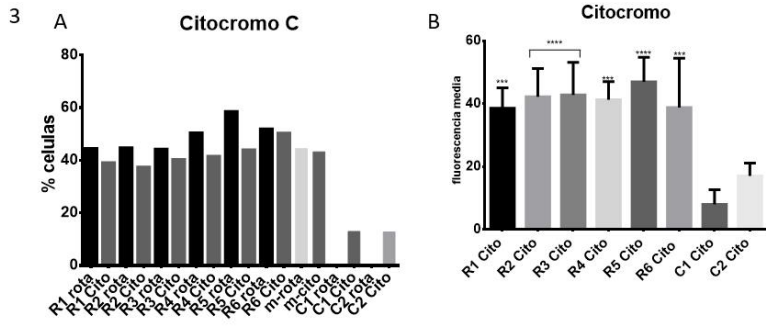
1. El rotavirus WTEW posee la capacidad de infectar, replicarse, dispersarse (intratumoral y en metástasis) y generar señales de muerte celular en las células tumorales Sp2/O-Ag14 en el modelo in vivo Balb/c.
2. Hay baja presencia de anticuerpos anti-rotavirales en los ratones tratados con el virus WTEW.

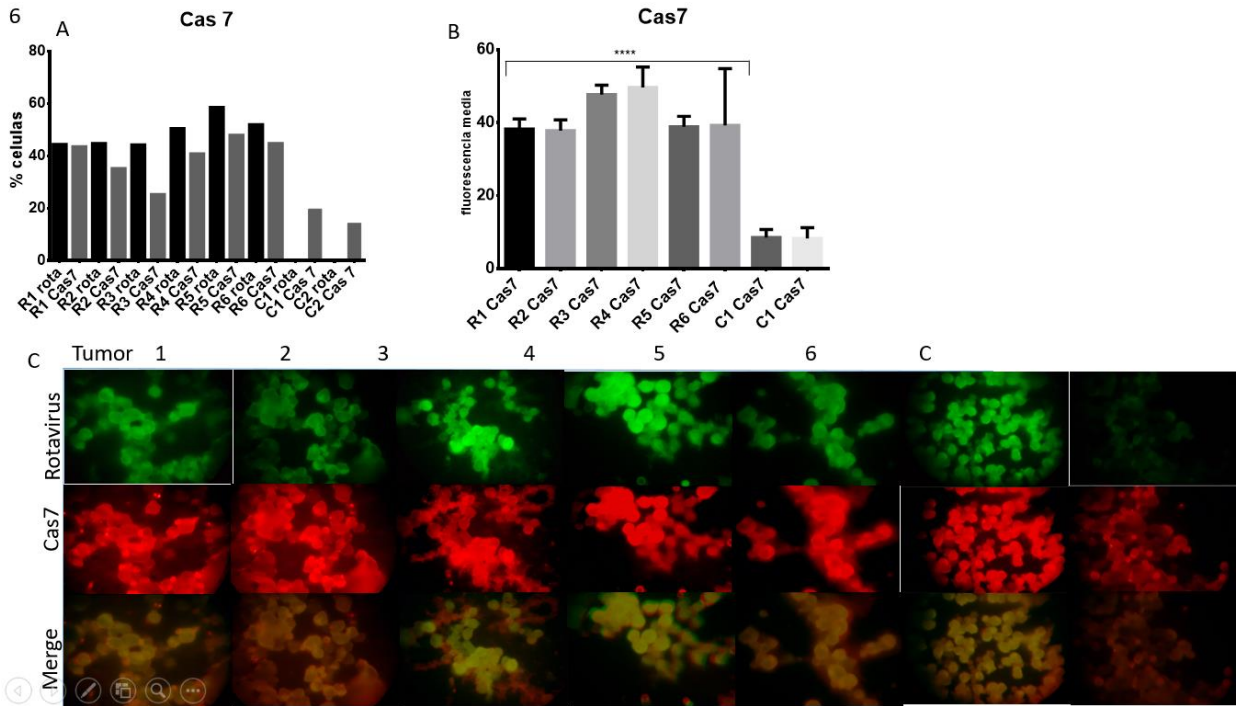
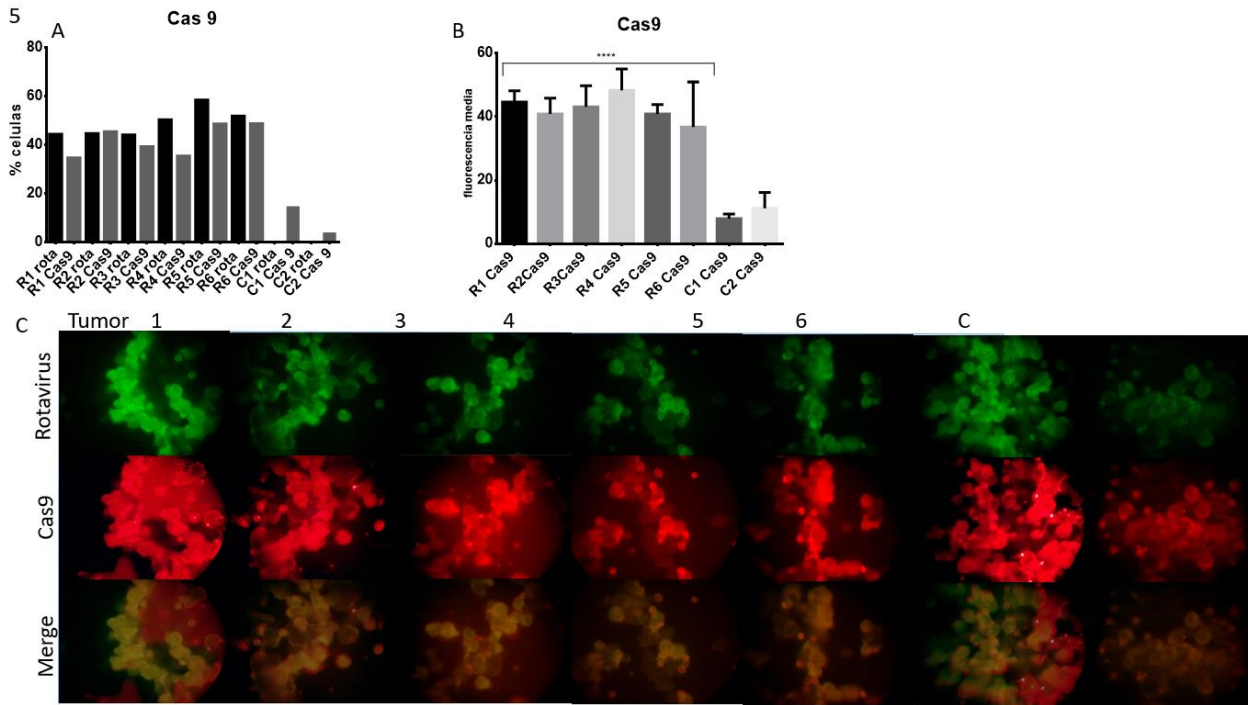
11.2 Recomendaciones

1. Llevar a cabo ensayos del modelo in vivo SP2/O Ag-14 con mayor MOI, con el fin de evaluar una posible regresión tumoral.
2. Cuantificar por RT-PCR los RNA rotavirales en los tumores infectados en el modelo in vivo para determinar la replicación viral.
3. Cuantificar mediadores inflamatorios como $IFN\gamma$, IL-2, IL-4 y $TNF\alpha$ o infiltración linfocitaria con el fin de evaluar la respuesta inmune antitumoral mediada por la infección rotaviral en el modelo in vivo.

12. ANEXO A: Presencia de antígenos relacionados con muerte celular e infección rotaviral individuales







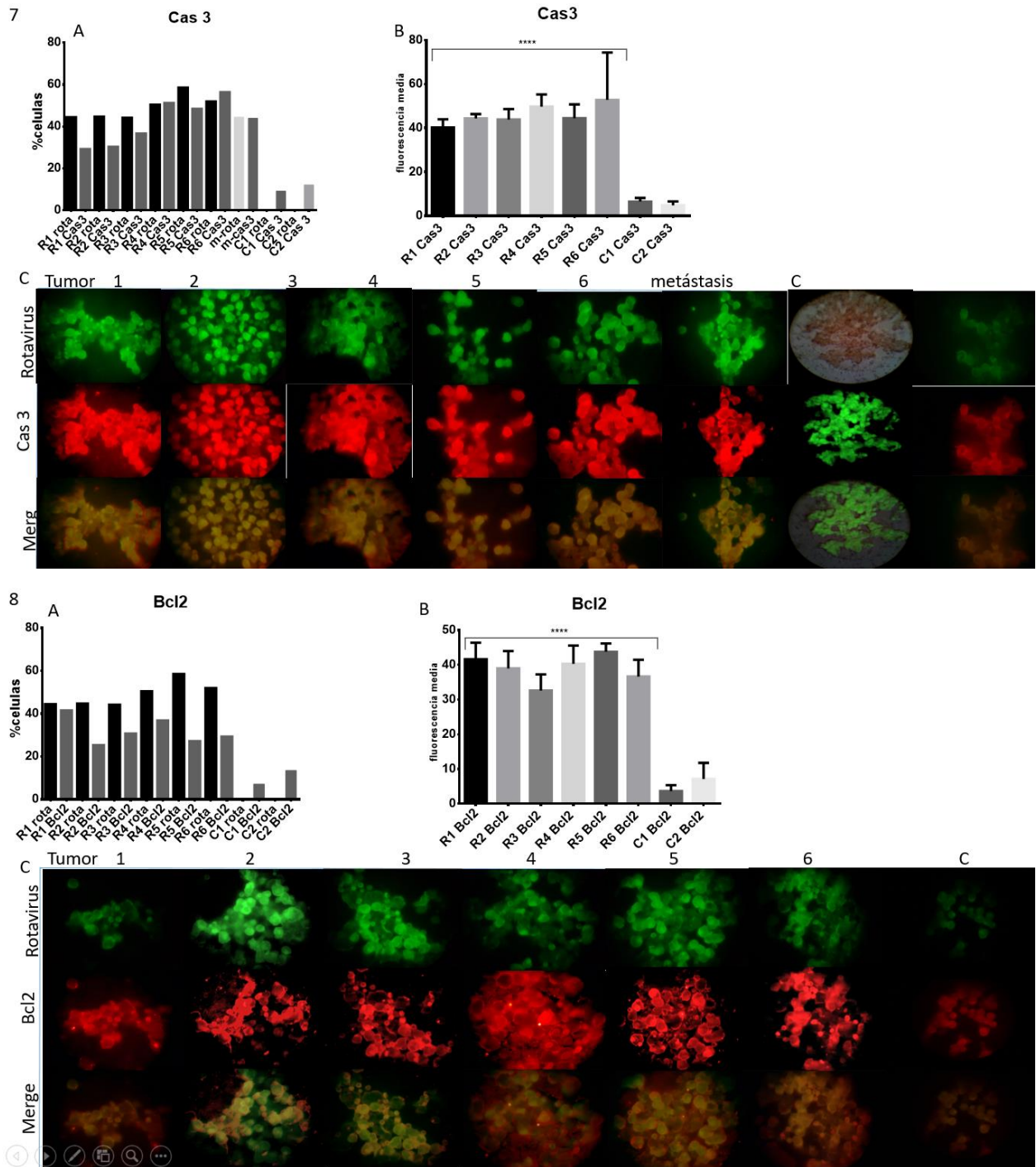


Figure 9 inmunofluorescencia de antígenos rotavirales y antígenos relacionados con muerte celular: Los tumores de los ratones infectados y ratones no infectados fueron extraídos posterior a la eutanasia, estos fueron sometidos a ensayos de inmunofluorescencia por medio de anticuerpos policlonales para antígenos rotavirales y anticuerpos monoclonales anti- Bax, Bid, citocromo c, Smac, cas9, cas3 y Bcl2, y se agregaron anticuerpos secundarios conjugados con FITC y Alexa 568, (A) porcentaje de células positivas para antígeno relacionado con muerte celular y antígenos rotavirales. (B) fluorescencia media de las fotos tomadas. (C) fotos representativas de cada uno de los tumores analizados por inmunofluorescencia.

13. BIBLIOGRAFIA

- [1] Bohorquez Maria et al., «El cancer, aspectos básicos sobre su biología,clínica,prevención y tratamiento,» *Ministerio de Protección Social. Instituto Nacional de Cancerología*, 2004.
- [2] K.-W. P. J. C. B. Stephen J Russell, «Oncolytic virotherapy. Review. Volume 30 Number 7,» *Nature Biotechnology*, 7 july 2012.
- [3] Norman Kara L. et al., «Reovirus oncolysis: The Ras/RalGEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection,» *University medical Center*, vol. 101, 2004.
- [4] Clarke et al., «Mechanism of Reovirus-induced Cell Death an Tissue Injury: Role of Apoptosis and Virus-induced Perturbation of Host-Cell Signaling and Transcription Factor Activation,» *Viral Immunol*, vol. 18, nº 1, pp. 89-115, 2005.
- [5] Clarke et al., «Apoptosis During Reovirus Infection,» *Curr Top Microbiol immunol*, vol. 289, pp. 1-24, 2005.
- [6] Shizuko Sei, Jodie K Mussio, Quan-en Yang, Kunio Nagashima, et al , «Synergistic antitumor activity of oncolytic reovirus and chemotherapeutic agents in non-small cell lung cancer cells,» *Molecular Cancer* , vol. 8, nº 47, 2009.
- [7] Shmulevitz Maya, Marcato Paola, WK Lee Patrick , «Unshackling the links between reovirus oncolysis, Ras signaling, translational control and cancer,» *Oncogene*, vol. 24, p. 7720–7728, 2005.
- [8] Comins C. , Heinemann L. , Harrington K. , Melcher A. , et al., «Reovirus: Viral Therapy for Cancer ‘as Nature Intended’,» *Clinical Oncology*, vol. 20, pp. 548-554, 2008.
- [9] Rodríguez Díaz J, «Estudios sobre la inmunogenicidad y los mecanismos fisiopatológicos de la proteína NSP4 de rotavirus.,» *Valencia: Servei de Publicacions, Universitat de València*, 2005.
- [10] Guerrero CA, Guerrero RA, Silva E, Acosta O, Barreto E , « Experimental Adaptation of Rotaviruses to Tumor Cell Lines.,» *PLoS ONE* , vol. 11, nº 2, p. e0147666. , 2016.
- [11] Andtbacka R. H. et al, «Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma,» *J. Clin.Oncol.*, 2015.
- [12] Anthony SJ et al, «A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals,» *mBio*, vol. 4, p. e00598–e00513, 2013.
- [13] Wennier S, Shoudong L, et. al., «Oncolytic virotherapy for pancreatic cancer.,» *NIH Public Access. Expert Rev Mol Med. Author Manuscript*, 2011.
- [14] Hanahan, D. & Weinberg, R. A, «Hallmarks of cancer: the next generation.,» *Cell*, vol. 144, pp. 646-674, 2011.

- [15] Zamarin D, et al., «Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy,» *Sci. Transl Med.*, vol. 6, p. 226ra32, 2014.
- [16] Guido W, Ozduman K, et.al., «Oncolytic Virus Therapy of Glioblastoma Multiforme-Concepts and Candidates,» *Cancer J.*, vol. 18, n° 1, pp. 69-81, 2012.
- [17] Meurs E, et al, «Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon,» *Cell*, vol. 62, pp. 379-390, 1990.
- [18] Elde NC, Child SJ, Geballe AP & Malik HS, «Protein kinase R reveals an evolutionary model for defeating viral mimicry,» *Nature*, vol. 457, pp. 485-489, 2009.
- [19] Zamarin D, et al., «Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy,» *Sci. Transl Med.*, vol. 6, p. 226ra32, 2014.
- [20] Kaufman HL , Kohlhapp F J, Zloza A , «Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs,» *Nature reviews*, vol. 14, 2015.
- [21] Friedman GK, et. al., «Yancey Targeting pediatric cancer stem cells with oncolytic virotherapy.,» *Pediatric Research.*, vol. 71, n° 4, 2012.
- [22] Stojdl DF, et.al., «Exploiting tumor specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus,» *Nat Med.*, vol. 6, pp. 821-825, 2000.
- [23] Wang F et.al, «Disruption of ERK-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier,» *Nat immunol.*, vol. 5, pp. 1266-1274, 2004.
- [24] Kohlhapp F.J, Kaufman L., «Molecular Pathways: Mechanism of Action for Talimogene Laherparepvec, a New Oncolytic Virus Immunotherapy,» *Clin Cancer Res*, , vol. 22, n° 5, pp. 1048-1054, 2016.
- [25] Clarke et al., «Mechanisms of Apoptosis During Reovirus Infection,» *Curr Top Microbiol immunol*, vol. 289, pp. 1-24, 2005.
- [26] Clarke P, Meintzer SM, Gibson S, et al. , « Reo-virus-induced apoptosis is mediated by TRAIL,» *J. Virol*, vol. 74, pp. 8135-8139, 2000.
- [27] Clarke P, Meintzer SM, Wang Y, et al, «JNK regulates the release of pro-apoptotic mitochondrial actors in reovirus-infected cells,» *J. Virol*, vol. 78, p. 13132–13138, 2004.
- [28] Hirasawa K, et.al., «Systematic Reovirus Therapy of Metastatic Cancer in immune-competent Mice,» *Cancer Research*, vol. 63, n° 2, pp. 348-353, 15 January 2003.
- [29] Marcato P, A Dean C, Giacomantonio CA, Lee PWK , «Oncolytic Reovirus Effectively Targets Breast Cancer Stem Cells,» *Molecular Therapy*, vol. 17, n° 6, pp. 972-979, 2009.

- [30] Errington F et.al., «Inflammatory tumour cell killing by oncolytic reovirus for the treatment of melanoma,» *Gene Therapy*, vol. 15, pp. 1257-1270, 2008.
- [31] White CL et.al., «Characterization of the adaptive and innate immune response to intravenous oncolytic reovirus (Dearing type 3) during a phase I clinical trial,» *Gene Therapy*, vol. 15, p. 911–920, 2008.
- [32] Zoyza L. et al., «Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: rotavirus and colera immunization,» *Bull World Health Organ*, vol. 63, pp. 569-583, 1985.
- [33] G. C. B. J. G. R. Parashar UD, «Rotavirus and severe childhood diarrhea,» *Emerg Infect Dis*, vol. 12, pp. 304-306, 2006.
- [34] M. D. B. G. E. M. Mattion NM, «Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11,» *Virology*, vol. 181, p. 295–304, 1991.
- [35] C. M. ., M. L. ., G. C. Acosta LO, «Un modelo del mecanismo de entrada de los rotavirus a la célula hospedera,» *Facultad de Medicina*, vol. 57, pp. 124-148, 2009.
- [36] K. A. B. J. V. P. G. H. Ludert JE, «Cleavage of rotavirus VP4 in vivo,» *J Gen Virol*, vol. 77, pp. 391-395, 1996.
- [37] R. P. A. V. L. S. Arias CF, «Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity,» *J Virol.*, vol. 70, pp. 5832-5839, 1996.
- [38] H. J. C. A. P. D. C. J. Benureau Y, «Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilization of outer capsid proteins,» *J Gen Virol*, vol. 86, pp. 3143-3151, 2005.
- [39] E. R. R. P. M. E. A. C. L. S. Zarate S, «Characterization of rotavirus cell entry,» *J Virol*, vol. 78, nº 5, pp. 2310-2318, 2004.
- [40] Zarate S, Espinosa R, Romero P, Mendez E, Arias CF, López S, «The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells,» *J Virol*, vol. 74, pp. 593-599, 2000.
- [41] B. M. P. J. Michelle MA, «Rotavirus NSP1 Mediates Degradation of Interferon Regulatory Factors through Targeting of the Dimerization Domain,» *Journal of Virology*, vol. 87, nº 17, pp. 9813-9821, 2013.
- [42] Taraporewala ZF, Patton JT, «Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2,» *J Virol*, vol. 75, p. 4519–4527, 2001.
- [43] Gratia M, Sarot E, Vende P, Charpilienne A, et al, «Rotavirus NSP3 is a translational surrogate of the PABP-poly(A) complex,» *J. Virol*, pp. 402-415, 2015.
- [44] Keryer-Bibens C, Legagneux V, Namanda-Vanderbeken A, Cosson B, et al, «The rotaviral NSP3 protein stimulates translation of polyadenylated target mRNAs independently of its RNA-binding domain,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 390, p. 302–306, 2009.

- [45] M. M. A. Chung K T, «Regulation of gene expression by the NSP1 and NSP3 non-structural proteins of rotavirus,» *Arch Virol*, vol. 156, p. 2197–2203, 2011.
- [46] Hyser J M, Collinson-Pautz MR, Utama B, Estes MK., «Rotavirus Disrupts Calcium Homeostasis by NSP4 Viroporin Activity,» *mBio*, vol. 1, nº 5, 2010.
- [47] Taraporewala ZF, Patton JT. , «Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae,» *Virus Research*, vol. 101, nº 1, pp. 57-66, 2004.
- [48] Blackhall J, Fuentes A, Hansen K, Magnusson G., «Serine protein kinase activity associated with rotavirus phosphoprotein NSP5,» *J Virol*, vol. 71, p. 138–144, 1997.
- [49] Campagna M, Budini M, Arnoldi F, Desselberger U, Allende JE, Burrone OR., «Impaired hyperphosphorylation of rotavirus NSP5 in cells depleted of casein kinase 1alpha is associated with the formation of viroplasm with altered morphology and a moderate decrease in virus replication,» *J Gen Virol*, vol. 88, p. 2800–2810, 2007.
- [50] Hoshino Y, Kapikian A, «Rotavirus Serotypes: Classification and Importance in Epidemiology, Immunity, and Vaccine Development,» *J HEALTH POPUL NUTR* , vol. 18, nº 1, pp. 5-14, 2000.
- [51] José M, Bishop R., «Scaling properties and symmetrical patterns in the epidemiology of rotavirus infection,» *THE ROYAL SOCIETY*, vol. 358, pp. 1625-1641, 2003.
- [52] López P, Cáceres D, Medina E., «Enfermedad por rotavirus Características epidemiológicas, clínicas, prevención y manejo,» *CCAP*, vol. 6, nº 2, pp. 45-55.
- [53] Kane EM, Turcios RM, Arvay ML, Garcia S, Bresee JS, Glass RI, «The epidemiology of rotavirus diarrhea in Latin America. Anticipating rotavirus vaccines,» *Rev Panam Salud Publica*, vol. 16, nº 6, pp. 371-7, 2004.
- [54] Torres MA, González R.A. , Duarte M, Poncet D, López S, Arias C., «The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6,» *The Journal of general Virology*, vol. 81, nº 3, pp. 821-830, 2000.
- [55] Hasehorst T. , «Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion,» *Nature and Chemical Biology*, vol. 5, pp. 91-93, 2009.
- [56] Zárate S, Romero P, Espinosa R, Arias CF, López S., «VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin alpha v beta 3 through a novel integrin-binding site.,» *J. Virol*, vol. 72, nº 20, pp. 10839-47, october 2004.
- [57] Vende P. et al., «RNA-Binding Activity of the Rotavirus Phosphoprotein NSP5 Includes Affinity for Double-Stranded RNA,» *Journal of Virology*, vol. 76, nº 10, pp. 5291-5299, 2002.

- [58] Gutierrez C, Isa P, Sanchez C, Perez J, Espinosa R, Arias C, Lopez S., «Different Rotavirus Strains Enter MA104 Cells through Different Endocytic Pathways: the Role of Clathrin-Mediated Endocytosis,» *Journal of Virology*, vol. 84, nº 18, pp. 9161-9169, 2010.
- [59] Sánchez-San Martín C, Lopez T, Arias CF, Lopez S , «Characterization of Rotavirus Cell Entry,» *Journal of virology*, vol. 78, nº 5, p. 2310–2318, 2004.
- [60] Rodriguez Diaz J, «Estudios sobre inmunogenicidad y los mecanimos fisiopatológicos de la proteína NSP4 de rotavirus (Tesis Doctoral),» *Valencia: Servei de Publicacions*, 2005.
- [61] Estes MK, D.Y.G., Herba CP, Smith EM , «Simian Rotavirus Replication in Cell Cultures,» *J.Virol*, vol. 31, nº 3, p. 5832, 1996.
- [62] Aoki ST, et al, «Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab,» *Science*, vol. 324, p. 1444–1447, 2009.
- [63] Ruiz M, León T, Diaz Y, Michelangeli F., «Molecular biology of rotavirus entry and replication,» *Scientific World Journal*, vol. 16, nº 9, pp. 1476-1497, 2009.
- [64] Cohen, M.K.E.a.J., «Rotavirus gene structure and function,» *Microbiol Rev*, vol. 53, nº 4, p. 410, 1989.
- [65] Sánchez-San MC, Carlos FA, López S , «Characterization of Rotavirus Cell Entry,» *J. Virol*, vol. 78, nº 5, p. 2310, 2004.
- [66] McDonald SM, Patton JT., «Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome,» *Trends in Microbiology*, vol. 19, nº 3, pp. 136-144, 2011.
- [67] Bergmann CC, Maass D, Poruchynsky MS, Atkinson PH, Bellamy AR, «Topology of the nonstructural rotavirus receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmic reticulum,» *EMBO J*, vol. 8, p. 1695–1703, 1989.
- [68] Bowman GD, et al, «Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus reveals,» *J Mol Biol*, vol. 304, p. 861–871, 2000.
- [69] Trask SD, Dormitzer PR, «Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins,» *J Virol*, vol. 80, p. 11293–11304, 2006.
- [70] O'Brien JA, Taylor JA, Bellamy AR, «Probing the structure of rotavirus NSP4: a short sequence at,» *J Virol*, vol. 74, p. 5388–5394, 2000.
- [71] Taylor JA, O'Brien JA, Yeager M, «The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulumlocalized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains,» *EMBO J*, vol. 15, p. 4469–4476, 1996.
- [72] Poruchynsky MS, Atkinson PH, «Rotavirus protein rearrangements in purified membraneenveloped intermediate particles.,» *J Virol*, vol. 65, p. 4720–4727, 1991.

- [73] Gonzalez RA, Espinosa R, Romero P, Lopez S, Arias CF, «Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells.,» *Arch Virol*, vol. 145, pp. 1963-1967, 2000.
- [74] Michelle M. Arnold, Mario Barro, John T. Patton, «Rotavirus NSP1 Mediates Degradation of Interferon Regulatory Factors through Targeting of the Dimerization Domain,» *Journal of Virology*, vol. 87, nº 17, p. 9813–9821, 2013.
- [75] Piron M, Vende P, Cohen J, Poncet D, «Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F,» *The EMBO Journal*, vol. 17, nº 19, pp. 5811-5821, 1998.
- [76] Musalem C, Espejo RT, «Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11,» *Gen Virol*, vol. 66, p. :2715–2724, 1985.
- [77] Jourdan N, et al., «Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus,» *J Virol.*, vol. 71, p. 8268–8278, 1997.
- [78] ATCC, «ATCC,» [En línea]. Available: <https://www.atcc.org/en/Products/All/VR-2104.aspx>. [Último acceso: 28 03 2017].
- [79] U. D. o. H. a. H. Services, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Public Health Service, 2009.
- [80] Gruber CW, C.M, Heras B.,Martín JL, Craik DJ, «Protein disulfide isomerase: the structure of oxidativa folding.,» *Trends in biochemical sciences*, vol. 31, nº 8, pp. 455-64, 2006.
- [81] Wilkinson B, Gilbert H., «Protein disulfide isomerase,» *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1699, pp. 35-44, 2004.
- [82] Xu S, Sankar S, Nouri N., «Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy,» *Drug Discovery Today*, vol. 19, nº 3, pp. 222-240, 2014.
- [83] Vatolin S, Phillips J, Jha B et.al, «Novel Protein Disulfide Isomerase Inhibitor with Anticancer Activity in Multiple Myeloma,» *Cancer research*, vol. 76, nº 11, pp. 3340- 350, 2016.
- [84] Calderón MN, Guerrero CA, Domínguez Y, Garzón E, Barreto SM, Acosta O, «Interacción de rotavirus con la proteína disulfuro-isomerasa n vitro y en sistemas celulares,» *Biomédica*, vol. 31, pp. 70-81, 2011.
- [85] Juliano RL, Haskill S, «Signal transduction from the extracellular matrix.,» *J Cell Biol*, vol. 120, nº 3, pp. 577-85, 1993.
- [86] Ruoslahti E, Reed JC., «Anchorage dependence, integrins, and apoptosis,» *Cell*, vol. 77, nº 4, pp. 477-8, 1994.

- [87] Campbell I, Humphries M, «Integrin Structure, Activation, and Interactions,» *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 3, 2011.
- [88] Assoian R. K. & Klein E A, «Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness,» *Trends Cell Biol*, vol. 18, pp. 347-352, 2008.
- [89] Han J, et al., «Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin α IIb β 3,» *Curr. Biol.*, vol. 18, p. 1796–1806, 2006.
- [90] Desgrosellier J, Cheresch D., «Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities,» *Nature Reviews*, vol. 10, pp. 9-22, 2010.
- [91] Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Perez-Schael I., «Jennerian and modified Jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea using a quadrivalent rhesus rotavirus (RRV) and human-RRV reassortant vaccine,» *Arch Virol*, vol. 12, pp. 163-75, 1996.
- [92] Ludert JE, Feng N, Yu JH, Broome RL, Hoshino Y, Greenberg HB., «Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo,» *J Virol.*, vol. 70, n° 1, pp. 487-93., 1996 .
- [93] Méndez E, Arias CF, López S, «Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture,» *J Virol*, vol. 67, n° 9, pp. 5253-9, 1993.
- [94] Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ, «Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 94, pp. 5389-5394, 1997.
- [95] Guerrero CA, Mendez E, Zarate S, Isa P, Lopez S, Arias CF , «Integrin α v β 3 mediates rotavirus cell entry,» *PNAS*, vol. 97, n° 26, pp. 14644 -14649, 2000.
- [96] Graham KL, Halasz P, Tan Y, et al., *Journal of Virology*, vol. 77, n° 18, pp. 9969-9978, 2003.
- [97] Zarate S, Romero P, Espinosa R, Arias CF, Lopez S , «VP7 Mediates the Interaction of Rotaviruses with Integrin α v β 3 through a Novel Integrin-Binding Site,» *journal of Virology*, vol. 78, n° 20, p. 10839–10847, 2004.
- [98] Santana AY, Guerrero CA , «Implication of Hsc70, PDI and integrin α v β 3 involvement during entry of the murine rotavirus ECwt into small-intestinal villi of suckling mice,» *Arch Virol*, 2013.
- [99] Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M , «Molecular Chaperones in protein folding and proteostasis 324,» *Rev. Nature.*, vol. 475, n° 21, July 2011.
- [100] Tavaría M, G.T, Koll, Anderson RL , «A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family,» *Cell Stress Chaperones*, vol. 1, pp. 23-8, 1996.
- [101] Morano K, «New tricks for an old dog: the evolving world of Hsp70,» *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1113, pp. 1-14, 2007.

- [102] Haus U, T.P., Hartmann H, Lottpeich F, Noegel A, Schleicher M., «The heat shock cognate protein from Dictyostelium affect actin polimerization through intereaction with the actin-binding protein cap32/34,» *J Embo*, vol. 12, pp. 3763-3771, 1993.
- [103] Flaherty KM, M.D., Kabsch W, Holmes K.C., «Similarity of the tree-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein.,» *Pro.Natl.Acad.*, vol. 88, pp. 5041-5045, 1999.
- [104] Wu SJ, L.F., Hu SM, Wang C., , «Different combination of the hsc70 C-terminal functional groups are utilized to intereact with distinct tetraticopeptide-containing proteins,» *Biochem J*, vol. 359, pp. 419-426, 2001.
- [105] Guerrero CA, MLP, «Rotavirus receptor proteins Hsc70 and integrin $\alpha\beta 3$ are located in the lipid microdomains of animal intestinal cells,» *Acta virologico*, vol. 56, pp. 63-70, 2012.
- [106] Taipale M, Jarosz DD, Lindquist S, «HSP90 at the hub of protein homeostasis:emerging mechanistic insights.,» *Nature Rev. Mol. cell Biol.*, vol. 11, pp. 515-528, 2010.
- [107] Ciocca D et al., «Heat shock protein and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update.,» *Arch Toxicol*, vol. 1, p. 87, 2013.
- [108] Khaleque MA, et al., «Heat factor 1 represses estrogen-dependent transcriptiontrough association with MTA1.,» *Oncogene*, vol. 27, pp. 1886-1893, 2008.
- [109] Santana AY, «Participación de la proteína de choque termico HSC70, la integrina $\alpha\beta 3b$ y la proteína disulfuro isomerasa en el proceso de entrada del rotavirus homologo ECwt y heterologo RRV y Wa en cultivos primarios de las celulas intestinales de ratón lactante,» *in Facultad de Medicina*, p. 81, 2008.
- [110] Guerrero CA, Bouyssounade D, Zárate S, Iša P, López T, Espinosa R, et.al, «Heat Shock Cognate Protein 70 Is Involved in Rotavirus Cell Entry,» *Journal of virology*, vol. 76, nº 8, pp. 4096-4102, 2002.
- [111] Zárate S, Cuadras MA, Espinosa R, Romero P, Juárez KO, Camacho-Nuez M, Arias CF, López S , «Interaction of Rotaviruses with Hsc70 during Cell Entry Is Mediated by VP5,» *Journal of Virology*, vol. 77, nº 13, pp. 7254-7260, 2003.
- [112] Guerrero CA, Guerrero RA , Silva E, Acosta O, Barreto E, «Experimental Adaptation of Rotaviruses to Tumor Cell Lines,» *Plos One*, vol. 11, nº 2, 2016.
- [113] Santana A, Guerrero C, Acosta O, «Implication of Hsc70, PDI and integrin $\alpha\beta 3$ involvement during entry of the murine rotavirus ECwt into small-intestinal villi of suckling mice,» *Arch Virol*, vol. 158, p. 1323, 2013.
- [114] Chaïbi C, Cotte-Laffitte J, Sandré C, Esclatine A, Servin AL, Quéro AM, Géniteau-Legendre M, «Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells,» *Virology*, vol. 332, nº 2, pp. 480-490, 2005.

- [115] Superti F, Tinari A, Baldassarri L, Donelli G., «HT-29 cells: a new substrate for rotavirus growth.,» *Arch Virol.* , vol. 116, nº (1-4), pp. 159-73, 1991.
- [116] Guerrero rafael, «evaluación del potencial oncolítico del rotavirus en la línea celular de cancer de mieloma murino sp2/0-Ag14,» universidad nacional, bogota, 2015.
- [117] Marangoni et al., «A New Model of Patient Tumor-Derived Breast Cancer Xenografts for Preclinical Assays,» *Clin Cancer Res*, vol. 13, nº 13, pp. 3989-3998., 2007.
- [118] Jensen M.M, Jorgensen J, Binderup T, et. al, «Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper,» *BMC Medical Imaging*, vol. 8, nº 16, 2008.
- [119] Md. Zeyaulah, Mohan Patro, Irfan Ahmad, Kawthar Ibraheem, P. Sultan, M. Nehal, Arif Ali, «Oncolytic Viruses in the Treatment of Cancer: A Review of Current Strategies,» *Pathol. Oncol. Res.* , vol. 18, pp. 771-781, 2012.
- [120] Guerrero RA., «Evaluación del potencial oncolítico del rotavirus en la línea celular de cancer de mieloma murino Sp2/0-Ag14.,» *Maestría en Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia*, 2011.
- [121] Jafarlou M et al., «Monoclonal Antibody Production against *Aspergillus Fumigatus* in Ascetic Fluid,» *Sch. J. App. Med. Sci.*, vol. 3, nº 6A, pp. 2174-2177 , 2015.
- [122] Agnes E. et al., «The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids,,» *Molecular and Cellular Endocrinology* , vol. 355, pp. 2-13, 2011.
- [123] Huijuan Ma et al., «Immunosuppressive CD11b Ly6C monocytes in pristane-induced lupus,» *Journal of Leukocyte Biology* , vol. 99, pp. 1121-1129, 2016.
- [124] T Alain et al., «The oncolytic effect in vivo of reovirus on tumour cells that have survived reovirus cell killing in vitro,» *British Journal of Cancer* , vol. 95, pp. 1020-1027, 2006.
- [125] Steele L. et al., «Pro-inflammatory cytokine/chemokine production by reovirus treated melanoma cells is PKR/NF-kB mediated and supports innate and adaptive anti-tumour immune priming,» *Biomed Central*, vol. 10, nº 20, pp. 2-13, 2011.
- [126] Robin J. et al., «Immune-Mediated Antitumor Activity of Reovirus Is Required for Therapy and Is Independent of Direct Viral Oncolysis and Replication,» *Clin Cancer Res*, vol. 15, nº 13, pp. 4374-4381, 2009.
- [127] Contin R, F.A, M. Campagna and O.R. Burrone, «Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmatic proteins,» *Journal of General Virology*, vol. 91, p. 1782, 2010.
- [128] Dorer DE, Nettelbeck DM, «Targeting cancer by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis,» *Adv Drugs Deliv Rev*, vol. 61, pp. 554-571, 2009.

- [129] Guo ZS, Thorne SH, Barlett , «Oncolytic virotherapy: molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell mediated delivery of oncolytic viruses.» *Biochim Biophys Acta*, vol. 1785, pp. 217-231, 2008.
- [130] G. M. A. C. F. L. S. Pavel Isa, «Rotavirus Cell entry,» *Future viro*, vol. 3, nº 2, pp. 135-146, 2008.
- [131] Holloway G. et al., «Rotavirus NSP6 localizes to mitochondria via a predicted N-terminal α -helix,» *Journal of General Virology*, vol. 96, pp. 3519-3524, 2015.
- [132] Halaszt P. et al., «Death mechanisms in epithelial cells following rotavirus infection, exposure to inactivated rotavirus or genome transfection,» *Journal of General Virology*, vol. 91, pp. 2007-2018, 2010.
- [133] Nakano I. Et al., «Sudden Death from Systemic Rotavirus Infection and Detection of Nonstructural Rotavirus Proteins,» *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 49, nº 12, pp. 4382-4385, 2011.
- [134] Garant KA, Schmulevitz M et.al, «Oncolytic reovirus induces intracellular redistribution of Ras to promote apoptosis and progeny virus release,» *Oncogene*, vol. 35, nº 6, pp. 771-782, 2016.

